

Aus der I. Medizinischen Tierklinik,
Lehrstuhl für Innere Krankheiten,
Dermatologie und Neurologie der kleinen Haustiere
sowie für klinische Labordiagnostik der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Wilfried Kraft

Bestimmung von Serumalbumin und Serumglobulinen in Altersabhängigkeit beim Hund

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ruth Dusch, geb. Knorr
aus Stuttgart

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Referent:	Univ.-Prof. Dr. W. Kraft
Koreferent:	Prof. Dr. M. Goldberg

Tag der Promotion: 7. Februar 2003

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung.....	6
2 Literaturübersicht.....	7
2.1 Physiologie der Serum- und Plasmaproteine	7
2.1.1 Albumin	7
2.1.2 Globuline	8
2.1.2.1 α -Globuline.....	8
2.1.2.2 β -Globuline	8
2.1.2.3 γ -Globuline	8
2.1.2.3.1 Immunglobuline.....	8
2.2 Die Altersabhängigkeit des Gesamtproteins	11
2.2.1 Situation beim Hund	11
2.2.2 Situation bei anderen Tierarten.....	12
2.2.3 Situation beim Menschen.....	13
2.3 Die Altersabhängigkeit des Serumalbumins und der Serumglobuline beim Hund.....	14
2.3.1 Die Altersabhängigkeit der Immunglobulingruppen	16
2.3.2 Die Altersabhängigkeit einzelner Proteine	17
2.4 Einfluss der Umgebung, Trächtigkeit und Brunst auf die Serumproteinfraktionen	17
2.5 Wachstum, Altern und Lebenserwartung verschiedener Hunderassen	18
2.6 Prinzip und Problematik der verwendeten Labormethoden	19
2.6.1 Die Proteintrennung mit der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese ..	19
2.6.2 Die Albuminbestimmung mit der Bromcresolgrünmethode	21
2.7 Interpretation und Anwendung der Proteinelektrophorese.....	22
2.7.1 Akute-Phase-Proteine und Akute-Phase-Reaktion	22
2.7.1.1 Die Akute-Phase-Proteine des Menschen.....	23
2.7.1.2 Die Akute-Phase-Proteine des Hundes	23
2.7.2 Lebererkrankungen	24
2.7.3 Gammopathien.....	25
3 Material und Methodik	26
3.1 Material.....	26
3.1.1 Kriterien zur Auswahl der Probanden	26
3.1.2 Geschlechts-, Alters- und Rassenverteilung	26
3.1.2.1 Geschlechtsverteilung	27
3.1.2.2 Rassenverteilung.....	28
3.1.2.3 Altersverteilung	31
3.1.2.4 Gewichtsverteilung	32
3.1.2.5 Gewichtsklassen in den Altersgruppen.....	32
3.2 Methodik.....	34
3.2.1 Probengewinnung und Probenaufbereitung.....	34
3.2.2 Labormethoden	34
3.2.2.1 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	34
3.2.2.2 Bestimmung der Albuminkonzentration.....	35
3.2.2.3 Auftrennung der Proteinfraktionen.....	35
3.2.2.3.1 Auftrennung mit der Elpho-Mikro-Rapid-Kammer	35
3.2.2.3.2 Auftrennung mit Elphoscan Mini	36
3.2.3 Qualitätskontrolle.....	37
3.2.4 Statistik	37

4	Ergebnisse.....	38
4.1	Die Abhängigkeit der untersuchten Parameter vom Alter.....	38
4.1.1	Korrelation der Parameter mit dem Alter	38
4.1.1.1	Gesamtprotein.....	39
4.1.1.2	Albumin	39
4.1.1.3	α_1 -Globuline	39
4.1.1.4	α_2 -, β - und γ -Globuline.....	39
4.1.1.5	Albumin-Globulin-Quotient (A/G).....	40
4.1.2	Verlauf der Parameter in Abhängigkeit vom Alter.....	41
4.1.2.1	Gesamtprotein g/l.....	41
4.1.2.2	Albumin	42
4.1.2.3	α_1 -Globuline	46
4.1.2.4	α_2 -Globuline	49
4.1.2.5	β -Globuline	52
4.1.2.6	γ -Globuline	55
4.1.2.7	Albumin-Globulin-Quotient (A/G).....	57
4.1.2.8	Elektropherogramme	59
4.2	Vergleich der Gewichtsklassen innerhalb von Altersgruppen.....	62
4.3	Vergleich der Analysengeräte.....	64
5	Diskussion.....	70
5.1	Die Altersabhängigkeit des Gesamtproteins und der Proteinfractionen....	70
5.1.1	Gesamtprotein.....	70
5.1.2	Albumin	71
5.1.3	α_1 -Globuline	72
5.1.4	α_2 -Globuline	73
5.1.5	β -Globuline.....	74
5.1.6	γ -Globuline	75
5.1.7	Albumin-Globulin-Quotient	76
5.1.8	Abschließende Bemerkungen	76
5.1.9	Elektropherogramme	77
5.2	Vergleich von Gewichtsgruppen innerhalb von Altersgruppen	78
5.3	Vergleich der Analysengeräte.....	80
6	Zusammenfassung	83
7	Summary.....	85
8	Literaturverzeichnis	87
	Danksagung	97
	Lebenslauf.....	98

Abkürzungsverzeichnis

A	Albumin
Abb.	Abbildung
A/G	Albumin-Globulin-Quotient
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KGW	Körpergewicht
mA	Milliamper
r_s	Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
V.	Vena

1 Einleitung

Die Altersabhängigkeit vieler Blutbestandteile hat für die Interpretation von Laborergebnissen in der klinischen Labordiagnostik eine wichtige Bedeutung. Sind Kenntnisse über die Altersabhängigkeit des jeweiligen Parameters vorhanden, können physiologische Zustände, die durch das Alter des zu untersuchenden Tieres bedingt werden, nicht mit einem pathologischen Geschehen verwechselt werden.

Das Gesamtprotein unterliegt beim Hund, bei vielen anderen Tierarten und dem Menschen altersabhängigen Veränderungen. Da sich das Gesamtprotein aus verschiedenen Fraktionen (Albumin, Globuline) zusammensetzt, müssen sich zumindest für einen Teil der Fraktionen Veränderungen in Abhängigkeit vom Alter ergeben.

Verschiedene Studien haben sich mit der Altersabhängigkeit der Proteinfractionen beschäftigt, allerdings mit zum Teil sehr widersprüchlichen Ergebnissen. Die meisten Untersuchungen wurden entweder mit Hunden, die nur einer Rasse angehören, oder mit einer geringen Anzahl von Tieren durchgeführt. Bevorzugt befassen sich die Autoren mit dem Beagle, dem üblichen Versuchstier.

In der vorliegenden Arbeit wird dieses Problem anhand einer großen Anzahl von Hunden und einer großen Rassenvielfalt analysiert. Der Einfluss von unterschiedlicher Wachstumsdauer, unterschiedlichem Alterungsprozess und differierender Lebenserwartung bei kleinen, mittelgroßen, großen Rassen und Riesenrassen wird in diesem Zusammenhang diskutiert. Da zur Messung der Proben zwei Elektrophoresegeräte zur Verfügung standen, wurde zusätzlich ein Gerätevergleich durchgeführt.

2 Literaturübersicht

2.1 Physiologie der Serum- und Plasmaproteine

Die Plasmaproteine setzen sich aus mehreren hundert Proteinen zusammen, die viele verschiedene Funktionen haben. Unter anderem werden folgende Aufgaben von den Plasmaproteinen erfüllt: Belieferung der Gewebe mit Aminosäuren, Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks, Pufferwirkung zur Erhaltung des Säure-Basen-Status, Transport vieler Moleküle und Ionen, Aufrechterhaltung der Hämostase, Regulation der Entzündungsreaktion, spezifische Immunantwort (Thomas, 2000).

Zu den Serumproteinen gehören alle Proteine des Plasmas außer Fibrinogen (Eder, 1987).

Die Proteine werden entsprechend ihrem Verhalten bei der elektrophoretischen Trennung in die Fraktionen Albumin, α -, β - und γ -Globuline eingeteilt (Thomas, 2000).

2.1.1 Albumin

Das Albumin ist bei den meisten Haustieren und beim Menschen die stärkste einheitliche Fraktion. Es wird in der Leber synthetisiert. Sein Anteil beträgt bei Tieren 35 - 50 % des Gesamtproteins im Blut. Es erfüllt seine Transportfunktion durch Bindung von Stoffwechselzwischen- und Endprodukten, Hormonen, Vitaminen und Elektrolyten (Eder, 1987). Außerdem gewährleistet es die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen (onkotischen) Drucks und stellt eine Aminosäurenquelle für die Gewebe dar. Die Halbwertszeit beim Hund beträgt 8,2 Tage.

Das Präalbumin dient als Transportprotein für Thyroxin und wird ebenfalls in der Leber produziert. Es konnte im menschlichen Plasma und im Plasma einiger Tierarten identifiziert werden. Ein dem Präalbumin entsprechendes Protein gibt es auch beim Hund. Es wandert bei der elektrophoretischen Trennung in der α_2 -Globulin-Fraktion (Thomas, 2000).

2.1.2 Globuline

Nach der elektrophoretischen Trennung stellen sich mehrere Globulinfraktionen (α -, β - und γ -Globuline) dar (Thomas, 2000). Die Globuline werden mit Ausnahme der Immunglobuline, die in den lymphatischen Organen produziert werden, in der Leber synthetisiert. (Lösch et al., 2000).

2.1.2.1 α -Globuline

Die α -Globuline enthalten Glykoproteine, Gerinnungsfaktoren und weitere Proteine (Eder, 1987). Dieser Fraktion wird auch das Fetoprotein zugerechnet. In den ersten beiden Lebenswochen nimmt die Konzentration des Fetoproteins von $14,08 \pm 5,94$ mg/ml auf $70,21 \pm 52,92$ μ g/ml ab (Yamada et al., 1995). Die Werte der 13 erwachsenen Hunde, die an dieser Studie teilnahmen, werden von den Autoren mit 14 – 69 ng/ml und 130,41 – 193,80 ng/ml angegeben.

2.1.2.2 β -Globuline

Die β -Globuline bestehen aus Transferrin, weiteren Gerinnungsfaktoren und Lipoproteinen (Thomas, 2000).

2.1.2.3 γ -Globuline

Die γ -Fraktion wird hauptsächlich durch die Immunglobuline (Antikörper) gebildet (Eder, 1987). Sie enthält beim Tier IgG, IgM, IgA und IgE (Thomas, 2000).

2.1.2.3.1 Immunglobuline

Das häufigste Immunglobulin ist das Immunglobulin G (IgG). Es setzt sich beim Hund aus vier Unterklassen (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_{2c}) zusammen.

Den zweitgrößten Anteil bildet das Immunglobulin M (IgM) (Schultz, 1984). Nach Schultz (1984) wandert es beim Hund und bei der Katze in der β_2 -Fraktion. Bei einer primären Immunantwort (Erstkontakt der B-Lymphozyten mit einem Antigen) produzieren bisher unstimulierte B-Lymphozyten eine große Menge an IgM. Die sekundäre Immunantwort läuft ab, wenn Memory-B-Zellen, die sich aus

den B-Lymphozyten der primären Immunantwort entwickelt haben, mit dem Antigen erneut in Kontakt kommen. Daraufhin werden Antikörper der Immunglobulinklasse G gebildet (Modiano, 2000).

Immunglobulin A (IgA) gewährleistet die primäre Abwehr vieler lokaler Infektionen (Schultz, 1984). Man findet IgA in Tränen, in den Sekreten des Respirationstraktes, des Magen-Darm-Traktes und des Urogenitaltraktes und im Kolostrum (Kraft u. Dürr, 1999). Es wird in den lymphoiden Organen, die sich in der Schleimhaut der entsprechenden Organe befinden, produziert (Modiano, 2000).

Immunglobulin E (IgE) ist in so niedrigen Konzentrationen vorhanden, dass es durch die elektrophoretische Trennung nicht identifiziert werden kann. Es ist der Antikörpertyp, der mit der unmittelbaren Hypersensitivitätsreaktion in Verbindung steht. Zellen, die IgE produzieren, werden häufig in Geweben gefunden, die auch IgA produzieren. Deshalb wird vermutet, dass IgA eine Kontrollfunktion über die IgE-medierte Reaktionen ausübt. IgE konnte bei der Katze noch nicht nachgewiesen werden, hingegen ist es beim Hund nach Stimulation durch parasitäre Infektionen oder allergische Reaktionen meistens vorhanden.

Immunglobulin D konnte weder beim Hund noch bei der Katze identifiziert werden, kommt aber beim Menschen vor (Schultz, 1984).

Der niedrige Immunglobulinspiegel ist beim Hund im Vergleich zu anderen Tierarten auffällig. Ähnlich niedrige Werte beobachteten Meier et al. (1984) bisher nur bei Löwe und Tiger.

Tabelle 1: Überblick über die wichtigsten Globuline beim Tier (nach Thomas, 2000)

Globulin	elektro-phoretische Fraktion	Funktion
α_1 -Fetoprotein	α_1	unbekannt
α_1 -Proteinase-Inhibitor (α_1 -Antitrypsin)	α_1	Proteinaseinhibitor, Modulation der Entzündungsreaktion
Saures α_1 -Glykoprotein (Seromucoid, Orosomucoid)	α_1	Regulation der Immunantwort
α_1 -Antichymotrypsin	α_1	Enzyminhibitor
High-density Lipoprotein (HDL)	α	Cholesteroltransport
α_2 -Makroglobulin	α_2	Proteinaseinhibitor
Ceruloplasmin	α_2	Transport von Kupfer
Haptoglobulin	α_2	Bindung von freiem Hämoglobin, Regulation der Immunantwort
Serum-Amyloid A	α_2	vermutlich Regulation der Immunantwort und Lipoproteinmetabolismus
Low-density Lipoprotein (LDL)	β	Lipidtransport
Transferrin	β	Bindung und Transport von Eisen
Ferritin	β	Eisenspeicherung
C-reaktives Protein	β	Modulation der Entzündungsreaktion
Fibrinogen	β	Hämostase
Hämopexin	β	Bindung von Häm
Komplementkomponenten (C3, C4)	β	Komplementkaskade
IgA	γ	Immunabwehr
IgM	γ	Immunabwehr
IgG	γ	Immunabwehr

2.2 Die Altersabhängigkeit des Gesamtproteins

2.2.1 Situation beim Hund

Über das Ansteigen des Serumgesamtproteins mit zunehmendem Alter beim Hund liegen in der Literatur einige Angaben vor. Kraft et al. (1996) beschreiben eine signifikante Altersabhängigkeit des Gesamtproteins, die sich folgendermaßen verhält: beim Junghund zeigt sich ein langsamer Anstieg; die Werte erwachsener Tiere sind bei ein- bis zweijährigen Tieren annähernd erreicht. Tendenziell besteht zeitlebens ein weiteres Ansteigen des Serumproteins.

Schalm (1970) berichtet ebenfalls über einen lebenslangen Anstieg. Groulade et al. (1970), Kaspar u. Norris (1977) und Lowseth et al. (1990) machen keine weiteren Angaben bezüglich dem Verlauf des Anstiegs. Fukuda et al. (1989) zeigt für das Gesamtprotein einen stufenweisen Anstieg auf. Bei anderen Autoren stagniert der Anstieg mit acht Monaten (Bulgin et al., 1971) oder mit zwei Jahren (Michaelson et al., 1966).

McKelvie et al. (1966) stellt einen Anstieg des Totalproteins zwischen einer Gruppe von 100 - 140 Tage alten und einer Gruppe von 340 - 360 Tage alten Beaglen fest. In der Studie von Pickrell et al. (1974) haben die acht bis zehn Jahre alten Tiere (29 Stück, alle weiblich) etwas niedrigere Werte als die fünf bis sieben Jahre alten Tiere. Bei Tomoda (1963) tendieren die alten, besonders die über zehn jährigen Hunde zu etwas niedrigeren Gesamtproteinwerten als jüngere, erwachsene Tiere. Kaspar u. Norris (1977) beobachten bei Beageln, die verschiedenen familiären Linien angehören, unterschiedliche Werte des Gesamtproteins und Albumins. Strasser et al. (1993) sprechen von einem tendenziellen, aber nicht signifikanten Anstieg des Serumproteins mit zunehmendem Alter.

Kuhl et al. (2000) haben Referenzwerte für das Gesamtprotein und das Albumin während der Säugeperiode (1. - 58. Lebenstag) definiert. Die Albumin- und Gesamteiweißkonzentrationen zeigen einen ähnlichen Verlauf während dieser Phase. Nach einem geringen Abfall der Werte bis zum zehnten Lebenstag erfolgt ein stetiger Anstieg (50. - 58. Tag: Albumin 2,9 g/dl und Gesamtprotein 4,75 g/dl). Die Werte von erwachsenen Hunden werden nicht annähernd erreicht. Die Autoren erklären sich die geringere Plasmaproteinkonzentration der Saugwelpen

und den initialen Konzentrationsabfall nach der Geburt durch eine noch unzureichende Synthesefähigkeit der Leber, die den Mehrbedarf an Proteinen durch das sich rasch erhöhende Plasmavolumen nicht ausreichend kompensieren kann (Wolford et al., 1988). Weitere Gründe werden von Rüsse (1971) und Kraft et al. (1996) aufgeführt. Das Absinken des Gesamtproteins und Albumins bis zum ca. zehnten Tag nach der Geburt und ein nachfolgender Anstieg dieser Werte wird auch von Rüsse (1971) beschrieben. Sie geht davon aus, dass eine der hohen Wachstumsrate entsprechende Resorption von Nährstoffen aus dem Magen-Darm-Trakt noch nicht möglich ist. Hundewelpen verdoppeln ihr Geburtsgewicht innerhalb von sechs bis sieben Tagen. Kraft et al. (1996) schließen nicht aus, dass die höhere Menge an Gesamtkörperwasser beim Welpen zu einer niedrigeren Gesamtproteinkonzentration beiträgt. Center und Hornbuckle (2001) geben für den acht Wochen alten Welpen ähnliche Albumin- und Gesamtproteinwerte an wie Kuhl et al. (2000).

Ikeuchi et al. (1991) untersuchten ausschließlich das Verhalten des Gesamtproteins sechs bis zwölf Monate alter Beaglehunde und fanden einen schrittweisen Anstieg des Gesamtproteins ohne Veränderungen des Albumins.

2.2.2 Situation bei anderen Tierarten

Ein Zusammenhang zwischen Gesamtproteinwerten und Alter wird auch bei anderen Tierarten dokumentiert. Green et al. (1982) berichten, dass bei Schweinen, Rindern und Schafen das Gesamtprotein mit zunehmendem Alter signifikant ansteigt. Dies beruht hauptsächlich auf einem deutlichen Anstieg der γ -Globuline. Die Untersuchungen von Tumbleson et al. (1973) an weiblichen Rindern stimmen hiermit überein. Die Autoren finden ausschließlich in der γ -Fraktion einen Anstieg.

Bei der Katze steigt das Gesamtprotein im ersten Lebensjahr deutlich an und bleibt im weiteren Lebensverlauf annähernd gleich (Kraft et al., 1996). Groulade et al. (1978) beobachtet bei der Katze einen deutlichen γ -Globulin Anstieg mit zunehmenden Alter.

Die Untersuchungen von Tasker (1978) bestätigen die altersbedingte Zunahme des Gesamtproteins für das Pferd. Die Albuminwerte sind bei jüngeren Tieren

höher, die Globulinwerte niedriger. Tomoda (1962) fand bei verschiedenen Haustieren (Rind, Pferd, Schaf, Ziege, Schwein, Hund, Katze, Hase) deutliche Unterschiede des Gesamtproteins und der relativen Serumproteinkonzentrationen zwischen Jung- und Adulttieren. Mbassa und Poulsen (1991) dokumentieren bei Ziegen einen klaren Anstieg des Gesamtproteins von der Geburt bis zum Alter von einem Jahr (ältere Tiere wurden von den Autoren nicht untersucht). In der zweiten bis vierten Lebenswoche kommt es allerdings zu einem sehr geringen Abfall des Gesamtproteins. Der erste Anstieg erfolgt bei Neugeborenen durch die Aufnahme von Kolostrum, danach kommt es zum allmählichen Aufbau von Immunglobulinen. Das kurzzeitige Absinken in der zweiten bis vierten Lebenswoche erfolgt durch das Verschwinden der Kolostrumproteine.

Untersuchungen an Ratten ergaben höhere Gesamtproteinwerte in der Gruppe der älteren Tiere. In mg/dl ausgedrückt hatten beide Altersgruppen die selben Albuminwerte. Allerdings sind die prozentualen Anteile der Albuminwerte bei jungen Ratten höher als bei erwachsenen Ratten (Salatka et al., 1971).

2.2.3 Situation beim Menschen

Witt und Trendlenburg (1982) zeigen einen Anstieg der Gesamtproteinkonzentration vom Neugeborenen bis zum zwölf Monate alten Kind auf. Beim 1-jährigen bis 16-jährigen Kind können keine steigenden Tendenzen des Gesamtproteins beobachtet werden. Die Autoren gehen deshalb davon aus, dass der Anstieg zu den etwas höher liegenden Werten von Erwachsenen erst nach dem 16. Lebensjahr stattfindet.

Abe et al. (1989) finden bei Kindern unter 15 Jahren ebenfalls deutlich niedrigere Gesamtproteinkonzentrationen als bei Erwachsenen. Reed et al. (1972) stellt bei seinen Untersuchungen an erwachsenen Personen keinen signifikanten Alterseffekt für das Gesamtprotein innerhalb dieser Altersgruppe fest. Das Albumin und der Albumin-Globulin-Quotient hingegen nehmen bei Erwachsenen mit zunehmendem Alter ab.

Für IgA und Haptoglobulin wurde ein Anstieg zwischen dem 19. und 60. Lebensjahr nachgewiesen (Behr et al., 1984). Das α_2 -Makroglobulin liegt bei

alten Menschen in höheren Konzentrationen als bei jungen vor (Rink u. Seyfarth, 1997).

2.3 Die Altersabhängigkeit des Serumalbumins und der Serumglobuline beim Hund

Ein altersabhängiger Anstieg der Proteinfractionen beim Hund ist mehrfach beschrieben, allerdings besteht keine Übereinstimmung hinsichtlich der Veränderungen der einzelnen Fraktionen. Barsanti et al. (1977) beschreiben einen Anstieg der β_2 - und γ -Globuline. Diese Autoren finden keine Veränderung des Albumins und des Gesamtproteins. Andere Autoren stimmen damit nicht überein. Bulgin et al. (1971) stellen den Anstieg aller Fraktionen (einschließlich des Albumins), mit Ausnahme der α -Fraktion, fest. Diese fällt schwach ab. Ab dem achten Lebensmonat verändern sich die Fraktionen nicht mehr. Über die Abnahme der absoluten Albuminwerte und Zunahme der Serumglobuline mit zunehmendem Alter sind sich folgende Autoren einig: Kaspar u. Norris (1977), Mosier (1989), Lowseth et al. (1990), Strasser et al. (1993). McKelvie et al. (1966) und Batamuzi et al. (1996) berichten über die Abnahme der prozentualen Albuminwerte mit steigendem Alter. Strasser et al. (1993) beschreiben einen altersabhängigen Anstieg der α_2 - und γ -Globuline und des Fibrinogens. Die α_1 - und β -Globuline unterliegen nach Aussage dieser Autoren keiner Altersabhängigkeit. Eine Zunahme des Fibrinogens beschreibt auch Mosier (1989). Pickrell et al. (1974) findet unter den Proteinfractionen nur bei den γ -Globulinen eine Erhöhung der Werte. Batamuzi et al. (1996) stellt einen Anstieg bei den β - und γ -Globulinen fest, während McKelvie et al. (1966) zusätzlich noch eine Zunahme der α_2 -Globuline findet. Diese Autoren berichten außerdem über ein Absinken der α_1 -Fraktion. Sie haben aber nur Tiere bis zum Alter von einem Jahr untersucht. In der Studie von Batamuzi et al. (1996) kristallisieren sich für gesunde junge Hunde und gesunde alte Hunde zwei unterschiedliche, für jede Gruppe typische Elektrophoresemuster heraus. Bei jungen Tieren ist nach Groulade et al. (1970) das Elektrophoresemuster durch die Vorherrschaft der α_1 -Fraktion charakterisiert.

Tomoda (1963) schreibt, dass bei Embryonen und Neugeborenen Gesamtprotein und Albumin niedriger als bei Jung- und Adulttieren sind, die relative Konzentration von α - und β -Globulinen dagegen höher liegt. Während des Wachstums steigen die absoluten Konzentrationen von Albumin und γ -Globulinen kontinuierlich an und bleiben bei Adulttieren annähernd konstant. Alte Tiere tendieren zu etwas niedrigeren Gesamtprotein- und Albuminwerten und höheren γ -Globulinen.

In den Studien von McKelvie (1966), Bulgin (1971), Pickrell et al. (1974), Kaspar u. Norris (1977) und Lowseth et al. (1990) wurden Blutproben von Hunden der Rasse Beagle verwendet, die in Kolonien unter standardisierten Bedingungen gehalten wurden. Strasser et al. (1993) benutzte zwei Hunderassen (15 Beagle, 40 Deutsche Schäferhunde). Barsanti et al. (1977) und Batamuzi et al. (1996) haben Hunde verschiedener Rassen in ihre Untersuchungen einbezogen. Die Tierzahlen liegen bei 70 (Barsanti et al., 1977) und 55 (Batamuzi et al., 1996) Hunden. Tomoda (1963) führte seine Untersuchungen mit Mischlingen durch. Zur verwendeten Tierzahl macht er keine Angaben. Groulade et al. (1970) geben weder die genaue Tierzahl noch die Hunderassen an.

Rüsse (1971) hat das Verhalten der Globuline im Saugwelpenalter untersucht. α - und β -Globuline zeigen nur geringe Schwankungen während des Welpenalters. Die γ -Globuline steigen vom ersten bis zum vierten Tag an und fallen danach bis zum zweiten Lebensmonat signifikant ab. Vermutlich können die mütterlichen Immunglobuline der Kolostralmilch beim Hund bis zum vierten Tag übertragen werden. Die mütterlichen γ -Globulin-Reserven sind bis zum zweiten Lebensmonat erschöpft und der Welpen ist nun zur eigenen Antikörpersynthese fähig.

Für die Veränderungen der Proteinfractionen nach dem Welpenalter sind ebenfalls Begründungen gefunden worden.

Nach Strasser et al. (1993) kann die Abnahme der absoluten Albuminwerte auf einer geringeren Synthese durch die Leber beruhen. Die Leberfunktion nimmt bei alten Tieren in dem Maße ab, wie der Fettgehalt der Hepatozyten ansteigt und die

Anzahl der Hepatotyten absinkt. Zusätzlich liegt im fortgeschrittenen Alter eine perilobuläre Hepatofibrose vor (Goldston, 1995).

Der Anstieg der β - und γ -Globuline ist durch eine signifikante Immunantwort auf Antigene, denen die Tiere im Laufe ihres Lebens ausgesetzt waren, bedingt (z. B. Impfungen, wechselnde Umgebung, zurückliegende Krankheiten oder subklinische Erkrankungen) (Batamuzi et al., 1996).

Schultz (1984) stellt bei seinen Studien über die Beeinflussung des Immunsystems durch das Altern eine verringerte Antikörperproduktion (Immunglobuline) und eine abnehmende Antikörperantwort auf Antigene bei alten Individuen fest. Seine maximale Kapazität erreicht das Immunsystem nach der Pubertät.

2.3.1 Die Altersabhängigkeit der Immunglobulingruppen

Es liegen einige Literaturangaben über den altersabhängigen Anstieg der einzelnen Immunglobulingruppen vor. Schreiber et al. (1992) beschreiben einen klaren Anstieg des Immunglobulin IgA während des Lebensabschnitt von 0,8 bis 1,6 Jahre. In diesem Lebensabschnitt zeigen IgG und IgM hingegen nur einen leichten, tendenziellen Anstieg. An der Studie nahmen nur Hunde der Rasse Beagle im Alter zwischen 0,8 und 4,6 Jahren teil, die unter standardisierten pathogenfreien Bedingungen gehalten wurden. Glickman et al. (1988) können bei Beaglen einen klaren altersabhängigen Konzentrationsanstieg für IgA, IgM und IgG feststellen. Außerdem bestehen für IgA und IgM geschlechtsbedingte Unterschiede. Männliche Tiere haben signifikant höhere IgA-Konzentrationen als weibliche Tiere, und weibliche Tiere haben höhere IgM-Konzentrationen als männliche Tiere. Hunde der Rasse Deutscher Schäferhund haben eine höhere IgA-Serumkonzentration als Hunde anderer Rassen. Dies könnte auf einer primären Abweichung des IgA-Metabolismus dieser Rasse beruhen (Day et al., 1988).

Racine et al. (1999) weisen einen signifikanten Anstieg der IgE-Konzentration bis zum Alter von vier Jahren bei Beaglen nach. Die Studie von Giot-Wenk et al. (1999) kann die Altersabhängigkeit des IgE nicht eindeutig bestätigen. Die Autoren können eine signifikante Altersabhängigkeit des IgE nur für zwei der insgesamt vier untersuchten Tiergruppen feststellen. Die Gruppen, bei denen eine

Altersabhängigkeit des IgE nachgewiesen werden konnte, bestanden zum einen aus 29 Deutschen Schäferhunden und zum anderen aus 147 Beaglen. Die Tiere dieser beider Gruppen gehörten Versuchstierkolonien an. Die Gruppen, die keinen altersbedingten Anstieg des IgE zeigten, setzten sich zum einen aus 36 Hunden verschiedener Rassen („Haushunde“) und 21 Beaglen aus einer weiteren Versuchstierkolonie zusammen.

2.3.2 Die Altersabhängigkeit einzelner Proteine

Über die Altersabhängigkeit einzelner Proteine ist wenig bekannt. Hughes et al. (1995) können bei der Untersuchung von ein bis einschließlich elf Jahre alten Hunden keine Altersabhängigkeit für das α_1 -Antitrypsin feststellen. Ganrot (1968) beobachtet bei jüngeren Tieren höhere Konzentrationen des α_2 -Makroglobulins als bei erwachsenen Hunden. Das Maximum liegt ungefähr bei einem Jahr. Er schränkt die Aussagekraft dieses Ergebnisses aufgrund der niedrigen Tierzahl in den Altersgruppen selbst ein. Strasser et al. (2000) findet bei alten Hunden eine höhere Aktivität des Komplementsystems als bei jüngeren.

2.4 Einfluss der Umgebung, Trächtigkeit und Brunst auf die Serumproteinfraktionen

Osbaldiston (1972) verglich in einer Studie die Proteinwerte von Hunden, die als Hof- und Haushunde gehalten wurden, und Hunden, die in einer streng isolierten Gruppe lebten und nicht geimpft oder medikamentös behandelt wurden. Anders als von den Autoren erwartet, hatte die zweite Gruppe eine deutlich niedrigere Albuminkonzentration und eine deutlich höhere γ -Globulinkonzentration im Vergleich zur ersten Gruppe. Ähnliches stellten Kristensen u. Barsanti (1977) bei Katzen fest. In ihrer Studie hatten die Katzen, die in einer geschlossenen Kolonie lebten, höhere γ -Globulinkonzentrationen als Katzen, die als Haustiere gehalten wurden. Allerdings waren in dieser Studie die Kolonietiere ebenfalls geimpft. Die Autoren führen dies auf den hohen Stress der Tiere zurück.

Boguth (1954) untersuchte den Einfluss von Trächtigkeit und Brunst auf die Serumproteinkonzentration. In der zweiten Hälfte der Trächtigkeit nimmt die Serumkonzentration des Proteins beim Hund ab. Die Verschiebungen innerhalb der Fraktionen sind denen des Menschen sehr ähnlich (Albumingehalt sinkt, α - und β -Globuline steigen an). Die Brunst bleibt ohne Einfluss auf die Serumproteine.

2.5 Wachstum, Altern und Lebenserwartung verschiedener Hunderassen

Zum Erreichen des Erwachsenenalters verschiedener Hunderassen gibt es Untersuchungen von mehreren Autoren. Allard et al. (1988) fand nach Studien an Beaglen, Brittany Spaniern und Labrador Retrievern heraus, dass das Wachstum bei kleinen Hunderassen schneller abgeschlossen ist als bei großen und innerhalb einer Rasse ein Geschlechtsunterschied besteht. Männliche Beagles sind mit ca. 30 Wochen ausgewachsen. Weibliche Tiere schließen das Wachstum früher ab als männliche. Schulze et al. (1997) bestätigen diesen Geschlechtsdimorphismus durch ihre Untersuchungen für die Deutsche Dogge. Von Salomon et al. (1998) konnte dies aufgrund ihrer Daten zur postnatalen Gewichtszunahme des Beagles, zumindest für diese Hunderasse, nicht bestätigt werden. Aber auch sie ziehen in ihrem Aufsatz den Schluss, dass große Hunderassen länger wachsen als kleine.

Die Lebenserwartung von Hunden steht ebenfalls im Zusammenhang mit ihrer Größe und Rasse. Riesenrassen haben eine deutlich niedrigere Lebenserwartung als Hunde kleinerer Größe. Das Altern beginnt beim Hund zwischen dem siebten und zehnten Lebensjahr abhängig von Rasse oder Größe (Kraft, 1998). Bush (1993) setzt den Beginn des Seniorenalters etwas früher an. Nach seiner Meinung beginnt es bei den meisten Rassen mit einer durchschnittlichen Lebenserwartung von zwölf Jahren mit ungefähr sieben Jahren, bei großen Hunderassen mit einer Lebenserwartung von zehn Jahren und weniger beginnt es mit ungefähr fünf Jahren. Bronson (1982) sieht keinen Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Langlebigkeit und dem durchschnittlichen Gewicht einer Rasse. Vielmehr haben Rassen, die mit ihrem Körpergewicht Extreme erreichen, eine kürzere Lebenserwartung (z. B. Deutsche Dogge und Toypudel).

Goldston (1989) macht klare Angaben über das Erreichen des „geriatrischen“ Alters im Zusammenhang mit dem Körpergewicht (kleine Hunde (<10 kg) $11,48 \pm 1,86$ Jahre; mittelgroße Hunde (10 - 25 kg) $10,19 \pm 1,56$ Jahre; große Hunde (25,5 - 45 kg) $8,85 \pm 1,38$ Jahre; Rassen (>45 kg) $7,46 \pm 1,94$ Jahre). Diese Zahlen wurden anhand einer Umfrage unter amerikanischen Tierkliniken, praktischen Tierärzten und Veterinärpathologen ermittelt.

2.6 Prinzip und Problematik der verwendeten Labormethoden

2.6.1 Die Proteintrennung mit der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese

Wird die Proteintrennung mittels Elektrophorese durchgeführt, kann als Substrat sowohl Serum als auch Plasma verwendet werden. Normalerweise wird Serum verwendet, da durch das Fibrinogen im Plasma das Elektrophoresemuster in der β - und γ -Region häufig undeutlich wird.

Die Trennung der Proteine beruht auf ihrer Wanderungsstrecke im elektrischen Feld. Das Wandern im elektrischen Feld hängt von ihrer Ladung und Größe ab. Albumin ist ein relativ kleines Protein mit einer starken negativen Ladung und wandert deshalb am schnellsten. Danach folgen die etwas langsamer wandernden α -Globuline, dann die β -Globuline und zum Schluss die γ -Globuline, die sich am wenigsten von der Auftragsstelle entfernen (Thomas, 2000).

Bei der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese können bei gesunden Hunden folgende Fraktionen unterschieden werden: Albumin, α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 - und γ -Globuline (Osbaldeston, 1972). Phillips et al. (1978) unterteilt die α_2 -Fraktion nochmals in zwei Unterfraktionen. Kozma et al. (1967) teilt die β -Fraktion in β_1 -, β_2 - und β_3 -Globuline ein. Schütz (1971) hingegen teilt in sieben Fraktionen ein: Prä-Albumin, Albumin, α_0 -, α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 -, β_3 - und γ -Globuline.

Die Celluloseacetatfolien-Elektrophorese wurde 1957 von Kohn eingeführt. Er empfiehlt zur Proteintrennung die Verwendung eines Barbituratpuffers mit pH 8,6. Die Breite der Banden kann zu einem gewissen Maß durch die Pufferkonzentration, die Flüssigkeitsmenge in den Pufferbehältern, den Strom und die Trennzeit beeinflusst werden. Brackenridge (1961) untersucht, zusätzlich zu

den vier von Kohn (1957) genannten Parametern, die Beeinflussbarkeit der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese durch den Puffer-pH-Wert, die Länge der Acetatfolie und die Platzierung der Auftragsstelle. Diese Faktoren können die Auftrennung der Fraktionen ebenfalls beeinflussen. Korotzer et al. (1961) benutzen Ponceau S zur Färbung der durch die Celluloseacetatfolien-Elektrophorese getrennten Proteine und erhalten gute und reproduzierbare Ergebnisse. Bossuyt et al. (1998) zeigten, dass die Präzision automatischer Elektrophoresegeräte besser ist als die von konventionellen, mit Handarbeit betriebenen Geräten.

Der Vorteil der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese liegt darin, dass über alle Proteine einer Probe eine Aussage getroffen werden kann. Allerdings geht dies auf Kosten der Genauigkeit (Sauer u. Hirschberger, 1992). Slater et al. (1975) beschreiben als eine Fehlerquelle dieser Methode die unterschiedliche Farbstoffaffinität der Proteine. Im Allgemeinen bindet Albumin mehr Farbstoff pro Gewichtseinheit als die Globuline. Dies wurde von den Autoren allerdings nur für Amidoschwarz dargelegt. Der Albuminwert wird durch den prozentualen Anteil der an die Albuminfraktion gebundenen Farbe ermittelt. Diese Kalkulation bezieht sich auf das Gesamtprotein, das zuvor mit einer anderen Methode ermittelt wurde. Deshalb hat die Genauigkeit der Bestimmung des Gesamtproteins ebenfalls Einfluss auf die Messung der Fraktionen. Außerdem ergeben unterschiedliche Auswertungsgeräte differierende Ergebnisse. Weiterhin berichten die Autoren, dass bei der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese Proteine anderer Fraktionen die selbe Wanderungsstrecke bei der Proteintrennung im elektrischen Feld zurücklegen wie das Albumin.

Die Ursachen dafür, dass bei der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese Proteine anderer Fraktionen bis in die Albuminfraktion wandern, geben Blauärmel (1978) und Schütz (1971) an. Blauärmel (1978) begründet den höheren Anteil der Albuminfraktion bei der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese im Vergleich zu anderen elektrophoretischen Methoden damit, dass bei dieser Methode auf der Trägerfolie weniger freie Hydroxylgruppen vorhanden sind. Dadurch werden nur wenige Proteinmoleküle auf dem Träger adsorbiert, was wiederum zu einer Verschiebung der Werte zu Gunsten der schnell wandernden Albuminfraktion führt. Dies geschieht auf Kosten der α_1 -, α_2 - und β -Globuline. Die Celluloseacetatfolie adsorbiert Proteine nicht und setzt ihnen auf Grund des

großen Hohlraumvolumens (80 %) praktisch keine räumliche Behinderung entgegen (Schütz, 1971). Im Vergleich zur Papierelektrophorese zeigt sich in seiner Studie eine Verschiebung der mit der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese ermittelten Werte zu Gunsten des schnell wandernden Albumins.

Green et al. (1982) vergleichen die Albuminwerte verschiedener Tierarten, zum einen ermittelt durch die chemische Bromcresolgrünmethode, zum anderen mit der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese. Bei Ponys, Schafen und älteren Rindern sind die Werte gleich, jüngere Rinder und Schweine haben mit der Bromcresolgrünmethode höhere Werte. Bei Enten werden dagegen mit der Elektrophorese höhere Albuminwerte bestimmt. Nach Meinung der Autoren beruhen die unterschiedlichen Werte bei den Enten vermutlich darauf, dass das Prä-Albumin in der chemischen Methode nicht erfasst aber bei der Elektrophorese mitgemessen wird.

2.6.2 Die Albuminbestimmung mit der Bromcresolgrünmethode

Die Genauigkeit der Bromcresolgrünmethode wurde ebenfalls eingehend untersucht. Ihr Nachteil beruht darauf, dass Bromcresolgrün außer mit Albumin auch mit Proteinen in der α_1 -, α_2 - und β -Fraktion reagiert. Dies führt zu einer Überbewertung des Albumins. Besonders groß wird der Fehler wenn eine Erhöhung der Akute-Phase-Proteine vorliegt (Webster, 1974). Gustafsson (1976) konnte nachweisen, dass die Reaktion einer Serumprobe mit Bromcresolgrün in zwei Schritten abläuft. Die schnelle Reaktion, die unter einer Minute abläuft, wird durch das Albumin bedingt. Die Reaktion mit den langsameren Komponenten ist nach 30 Minuten abgeschlossen. Die meisten dieser Komponenten reagieren in den ersten fünf Minuten. Wird das Albumin in der ersten Minute nach Analysenbeginn bestimmt, sind die Ergebnisse genau und nicht durch andere Fraktionen beeinflusst. Die untersuchten langsamen Komponenten gehören zu den Akute-Phase-Proteinen. Slater et al. (1975) konnten eine gute Übereinstimmung zwischen Werten, die mit der Bromcresolgrünmethode und immunchemischen Methoden bestimmt wurden, nachweisen, wenn die Proben von gesunden Personen stammten. Bei verschiedenen Krankheiten (Zirrhose, nephrotischem Syndrom, Paraproteinämien) waren die Unterschiede deutlich.

2.7 Interpretation und Anwendung der Proteinelektrophorese

Bei der Interpretation der Elektrophorese ist die Kurvenform genauso wichtig wie jeder einzelne relative Wert (Groulade et al., 1970). Nach den Erfahrungen dieser Autoren hängt die Bedeutung der einzelnen erhaltenen Werte davon ab, ob die Kurve eine glatte Oberfläche, einen abgerundeten oder einen punktförmigen Gipfel hat. Diese drei Kurventypen zeigen einen länger andauernden Zustand, einen sich kürzlich geänderten Zustand (im Anfangsstadium oder im Zurückgehen) und einen Zustand der aktiven Entwicklung an.

Die Elektrophorese kann in der Diagnostik, bei Verlaufskontrollen und der Therapieüberwachung sehr von Nutzen sein (Vesselinovitch, 1959; Groulade et al., 1970; Osbaldiston, 1972; Phillips et al., 1978). Thomas (2000) und Kraft u. Dürr (1999) empfehlen die Durchführung einer Serumproteinelektrophorese, wenn bei einem Patienten eine Hypoglobulinämie oder Hyperglobulinämie auftritt, die anderweitig nicht abgeklärt werden kann. Die veränderten Elektrophoresemuster sind selten pathognomisch für eine bestimmte Krankheit, können aber in Verbindung mit anderen klinischen und labordiagnostischen Befunden eine wertvolle Hilfe sein. Viele Globuline liegen bei routinemäßigen Messungen in so geringen Mengen vor, dass sie im Elektropherogramm nicht festgestellt, sondern nur mit sensitiveren biochemischen Assays oder Immunoassays entdeckt werden können. Durch Krankheiten können die Globuline so stark ansteigen oder absinken, dass sich diese Veränderungen im Elektropherogramm widerspiegeln (Thomas, 2000). Bei der Diagnose von Akute-Phase-Reaktionen und Gammopathien und bei der Verlaufskontrolle von Leberkrankheiten kommt die Elektrophorese häufig zur Anwendung.

2.7.1 Akute-Phase-Proteine und Akute-Phase-Reaktion

Als Akute-Phase-Reaktion bezeichnet man die akute Krankheitsphase, in der klinisch die klassischen Entzündungszeichen auftreten (Gressner, 1994). Die lokalen Entzündungszeichen sind Rötung, Schwellung, Wärme, Schmerz und Funktionsstörung; die generalisierten Entzündungszeichen sind Fieber, Leukozytose und Veränderung der Plasmaproteinzusammensetzung (Messow u. Hermanns, 1990). Zu den Akute-Phase-Proteinen werden alle Plasmaproteine

gezählt, deren Konzentration während der Reaktion um mehr als 25 % zunimmt (Thompson et al., 1992). Ihr Anstieg äußert sich im Elektropherogramm durch eine Erhöhung der α - und β -Fraktion (Thomas, 2000).

Die Akute-Phase-Proteine können durch ihr Ansteigen während der Akute-Phase-Reaktion einen Gewebeuntergang infolge von Entzündung oder Infektion anzeigen, bevor er klinisch sichtbar wird (Eckersall u. Conner, 1988). Der Grad des Anstiegs ist weitgehend dem Ausmaß des Gewebeuntergangs entsprechend. Beim Ansprechen der Therapie sinken die Werte schnell wieder ab. Stellt sich kein Therapieerfolg ein, bleiben sie hoch (Kent, 1992). Die Funktionen der nachfolgend genannten Akute-Phase-Proteine sind aus Tab. 1 (Seite 9) ersichtlich.

2.7.1.1 Die Akute-Phase-Proteine des Menschen

C-reaktives Protein, Serum-Amyloid A, saures α_1 -Glykoprotein, α_1 -Antitrypsin, α_1 -Antichymotrypsin, Haptoglobin, Fibrinogen, C3, C4 und Ceruloplasmin sind die wesentlichen Akute-Phase-Proteine des Menschen (Greiling u. Gressner, 1994). Interleukin-1, Interleukin-6 und der Tumor-Nekrose-Faktor bewirken beim Menschen in der Leber die Bildung dieser Proteine, nachdem sie durch Entzündungszellen (Monozyten, Makrophagen etc.) am Ort der Entzündung freigesetzt wurden. Möglicherweise bewirkt jeder Faktor die Synthese einer unterschiedlichen Reihe von Proteinen (Thompson et al., 1992). Diese Zytokine werden bei alten Menschen nach Stimulation der Leukozyten vermehrt produziert (Rink u. Seyfarth, 1997). Beim Menschen fallen während der Akute-Phase-Reaktion außer Albumin auch Transferrin und Präalbumin als so genannte negative Akute-Phase-Reaktanten ab (Alper, 1974).

2.7.1.2 Die Akute-Phase-Proteine des Hundes

Die für den Menschen genannten Zytokine bewirken beim Hund ebenfalls die Synthese von Akute-Phase-Proteine in der Leber (Yamashita et al., 1994; Yamashita et al., 1994). Die von Strasser et al. (2000) untersuchten Zytokine Interleukin-1 und Tumor-Nekrose-Faktor zeigen beim Hund keine erhöhte Aktivität im Alter.

Das C-reaktive-Protein steigt beim Hund innerhalb der ersten 24 h einer Entzündungsreaktion stark an. Es zeigt einen Anstieg, bevor klinische oder

labordiagnostische Befunde vorhanden sind, und reagiert schon auf sehr geringe Entzündungsreize (Dillman u. Coles, 1966). Es verhält sich während der Akute-Phase-Reaktion sehr ähnlich wie das des Menschen (Riley u. Zontine, 1972). Die Produktion des C-reaktiven Proteins infolge einer akuten Entzündung ist beim erwachsenen Hund höher als beim Welpen (Hayashi et al., 2001).

Haptoglobin, Seromuroid (Conner et al., 1988) und Fibrinogen (Ganrot, 1973) zeigen während dieser Reaktion ebenfalls ein ähnliches Verhalten wie die entsprechenden Proteine beim Menschen. Ceruloplasmin hingegen steigt mehr an als beim Menschen (Conner et al., 1988). Ganrot (1973) findet im Gegensatz zu Conner et al. (1988) für das Seromuroid beim Hund ein stärkeres Ansteigen als beim Menschen.

Serum-Amyloid A gehört beim Hund ebenfalls zu den Akute-Phase-Reaktanten (Sellar et al., 1991). Nach chronischer Antigenstimulation (z. B. durch Bakterien) liegt es in hohen Konzentrationen vor (Tizard, 2000).

Das α_2 -Makroglobulin ist beim Hund im Gegensatz zu anderen Tierarten kein Akute-Phase-Protein (Conner et al., 1988).

Große Unterschiede zwischen Mensch und Hund bestehen beim Proteinase-Inhibitor-System. α_1 -Antichymotrypsin fehlt dem Hund (Eckersall u. Conner, 1988) und der α_1 -Proteinase-Inhibitor (α_1 -Antitrypsin) zeigt keinen signifikanten Anstieg bei Akute-Phase-Reaktionen (Eckersall u. Conner, 1988; Hughes et al., 1995).

Ein Abfallen des Albumins wird beim Hund während der Akute-Phase-Reaktion ebenfalls beobachtet (Ganrot, 1973).

2.7.2 Leberkrankheiten

Die Untersuchungen von Sevelius u. Andersson (1995) unterstreichen die Bedeutung der Elektrophorese bei der Beurteilung von Leberkrankheiten beim Hund. Über den Zustand der Leber und über die Prognose für den Hund liefert die elektrophoretische Proteintrennung bessere Informationen als andere diagnostische Verfahren, wie z. B. die Bestimmung der Leberenzyme oder der Serumgallensäuren.

2.7.3 Gammopathien

Veränderungen der γ -Fraktion können polyklonal oder monoklonal sein. Die Einteilung beruht auf der Breite des Peaks.

Polyklonal bedeutet, dass verschiedene Plasmazellklone eine erhöhte Produktion von Immunglobulinen durchführen. Jeder Plasmazellklon produziert einen spezifischen Antikörpertyp gegen ein spezifisches Antigen. Die polyklonale Bande hat im Elektropherogramm eine breite Basis. Polyklonale Gammopathien treten bei Infektionen (bakteriell, viral, parasitär, durch Rickettsien oder Pilze bedingt), immun-medierten oder neoplastischen Krankheiten auf (Thomas, 2000). Außerdem werden sie bei schweren Leberkrankheiten beobachtet (Sevelius u. Andersson, 1995).

Monoklonale Gammopathien liegen vor, wenn nur ein Klon aus Plasmazellen Immunglobuline produziert. Er bildet immer den selben Antikörpertyp. Dieser Peak hat eine schmale Basis (Nelson u. Couto, 1998). Um Paraproteinämien (monoklonale Gammopathien) zu entdecken, ist die Elektrophorese unentbehrlich, da die quantitative Bestimmung eines Immunglobulins mit einer immunochemischen Methode im Referenzbereich liegen kann, auch wenn eine Paraproteinämie vorliegt (Wicher u. Spence, 1987).

Häufig werden beim Hund monoklonale Gammopathien durch lymphoproliferative Krankheiten (Lymphom, multiples Myelom) verursacht. Weniger häufig treten bei dieser Tierart chronische Infektionskrankheiten (Ehrlichiose) oder Entzündungen (chronische Pyodermie, plasmazelluläre Gastroenteritis) als Ursachen auf. Es wird auch eine idiopathische Ursache vermutet (Thomas, 2000). Nelson u. Couto (2000) nennen die chronische lymphatische Leukämie, die Leishmaniose und die Waldenström-Makroglobulinämie als weitere Gründe.

Eine Erniedrigung der γ -Globuline bei gleichzeitig unverändertem Albumin kann durch eine Immunschwäche (erworben oder ererbt) oder bei Neugeborenen durch die unzureichende Aufnahme von Kolostrum verursacht sein (Thomas, 2000).

3 Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Kriterien zur Auswahl der Probanden

Die Probanden sind gesunde Hunde aus dem Patientengut der I. Medizinischen Tierklinik und der Chirurgischen Tierklinik der Universität München, dem Patientengut einer Kleintierklinik und Tiere, die von Privatpersonen und zwei Tierheimen zur Verfügung gestellt wurden. Die Hunde wurden in den Tierkliniken hauptsächlich zur Impfung, zur Vorsorgeuntersuchung oder zur Zuchtauglichkeitsuntersuchung vorgestellt.

Die Hunde, die in die Studie aufgenommen wurden, waren alle klinisch gesund, das heißt die klinische Untersuchung war unauffällig. Die Tiere bekamen keine Dauerbehandlung mit Medikamenten. Ausgenommen waren Medikamente, deren Wirkstoffe bis auf einen zu vernachlässigenden Anteil resorbiert werden (z. B. Frontline^R oder Exspot^R zur Ektoparasitenbekämpfung). Die letzte Eingabe von Medikamenten lag mindestens solange zurück, dass der Wirkstoff bis auf einen zu vernachlässigenden Anteil ausgeschieden war. Dies entspricht vier Halbwertszeiten.

3.1.2 Geschlechts-, Alters- und Rassenverteilung

Insgesamt wurden die Laborergebnisse von 406 Blutproben statistisch ausgewertet, die von 389 verschiedenen Hunden stammen. Von 15 Tieren wurden zwei Blutproben im Abstand von mindestens einem Jahr entnommen und untersucht. Von einem Welpen gelangten zwei Proben zur Untersuchung und zwar im Alter von sechs Wochen und zwölf Wochen. Die jüngsten Hunde, die an der Studie teilnahmen, waren sechs Wochen alt, die ältesten 16 Jahre.

3.1.2.1 Geschlechtsverteilung

Tabelle 2: Geschlechtsverteilung

Geschlecht	Anzahl
männlich	150
männlich kastriert	36
weiblich	151
weiblich kastriert	69

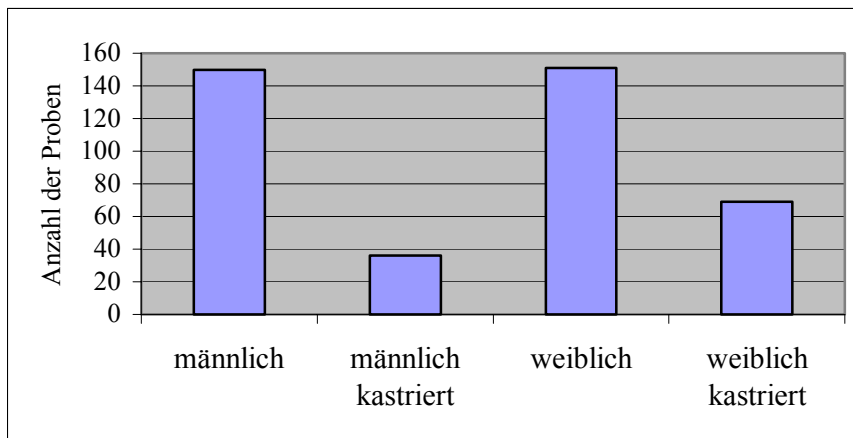


Abb. 1: Verteilung der Proben nach dem Geschlecht

Drei Hündinnen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung läufig.

3.1.2.2 Rassenverteilung

Die in die Untersuchungen einbezogenen Hunde gehören 69 verschiedenen Rassen an.

Tabelle 3: Rassenverteilung

Rasse	Anzahl (n)
Akita Inu	1
Australian Shepherd	2
Barsoi	1
Bastarde	145
Beagle	14
Bearded Collie	1
Border Collie	10
Bouvier de Flandres	1
Boxer	9
Briard	3
Cane Corso	1
Collie	4
Dackel (Kurzhaar, Rauhaar)	19
Dalmatiner	8
Deutsche Dogge	2
Dobermann	4
Französische Bulldogge	1
Groenendael	1
Hovawart	2
Holländischer Schapendoes	1
Husky	1
Irish Wolfshound	1
Kuvasz	4
Landseer	1
Leonberger	1
Lhasa Apso	2
Mastin Espanol	1
Münsterländer (kleiner, größer)	6

Fortsetzung nächste Seite

Rasse	Anzahl (n)
Neufundländer	2
Pinscher	1
Puli	2
Retriever (Golden R., Labrador R., Flat Coated R.)	36
Rhodesian Ridgeback	1
Rottweiler	8
Schäferhund (Deutscher Schäferhund, Kanadischer Schäferhund)	24
Schnauzer (Zwergschnauzer, Mittelschnauzer)	3
Setter (Irish Setter, Gordon Setter)	5
Spaniel (Cocker Spaniel, Springer Spaniel)	4
Spitz	1
Terrier (Airdale T., Dt. Jagdterrier, Jack Russel T., Cairn T., Border T., Fox T., Soft Coated Wheaten T., Welsh T., West-Highland-White T.)	30
Sennenhunde (Appenzeller S., Berner S., Entlebucher S.)	8
Tibet Terrier	2
Toyhunde (Chihuahua, Conton de Tuleat, Shi Zu, Yorkshire Terrier)	15
Vorstehhunde (Deutsch Drahthaar, Deutsch Kurzhaar, Magyar Vizsla, Weimaraner)	12
Zwergpudel	5

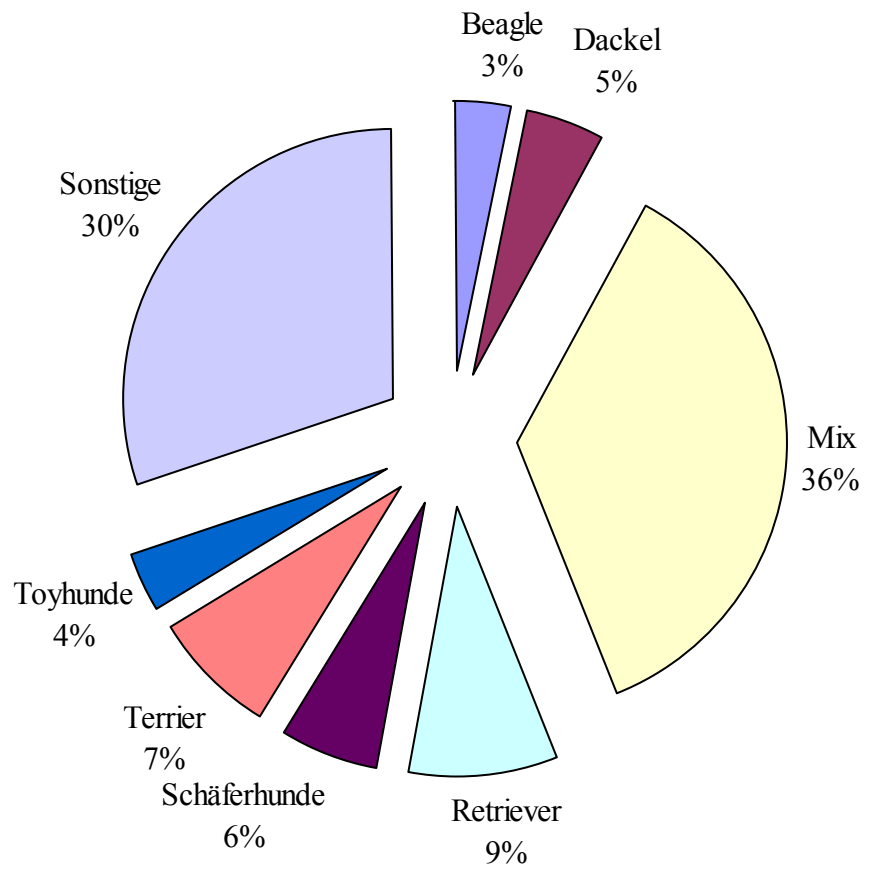


Abb. 2: Verteilung der Proben auf die Rassen

3.1.2.3 Altersverteilung

Die Hunde verteilen sich auf die verschiedenen Altersgruppen wie folgt. In Tabelle 4 und Abbildung 3 wird zusätzlich die Verteilung der Proben auf die Analysengeräte angezeigt.

Tabelle 4: Altersverteilung

Gruppe	Alter	Anzahl der Proben	Anzahl der Proben bestimmt mit Gerät 1	Anzahl der Proben bestimmt mit Gerät 2
1	0 bis 6 Wochen	9	9	9
2	>6 Wochen bis 4 Monate	18	18	17
3	>4 bis 6 Monate	14	14	14
4	>6 bis 12 Monate	33	32	31
5	>1 bis 2 Jahre	61	59	45
6	>2 bis 5 Jahre	113	111	90
7	>5 bis 8 Jahre	85	84	70
8	>8 bis 10 Jahre	41	39	37
9	>10 Jahre	32	31	24

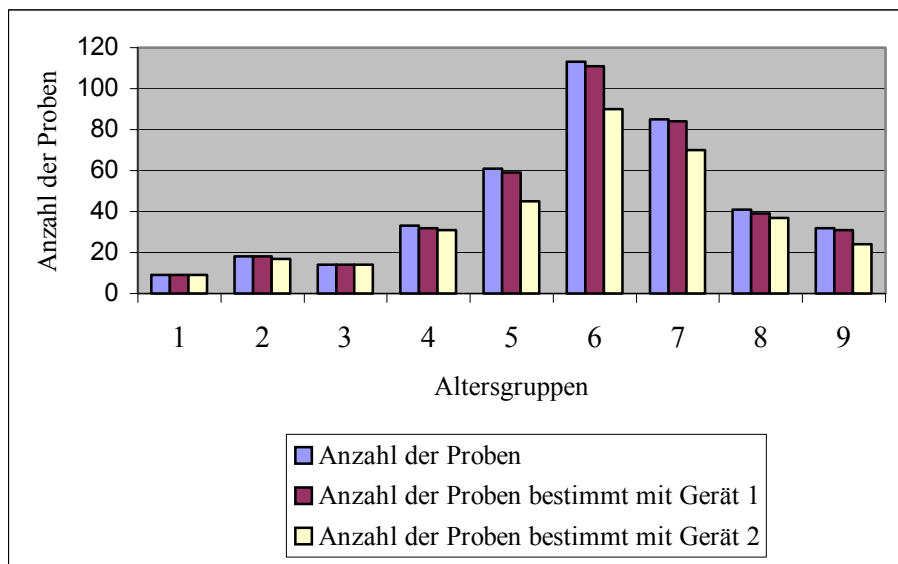


Abb. 3: Verteilung der Proben auf die Altersgruppen

3.1.2.4 Gewichtsverteilung

Die Hunde wurden in vier Gewichtsklassen eingeteilt. Welpen und Junghunde wurden entsprechend dem zu erwartenden Endgewicht den Gewichtsgruppen zugeordnet

Gewichtsklasse 1: Hunde bis 10 kg Körpergewicht

Gewichtsklasse 2: Hunde >10 bis 25 kg Körpergewicht

Gewichtsklasse 3: Hunde >25 bis 40 kg Körpergewicht

Gewichtsklasse 4: Hunde >40 kg Körpergewicht

3.1.2.5 Gewichtsklassen in den Altersgruppen

Um die unterschiedliche Lebenserwartung ebenso wie das unterschiedliche Wachstum und den differierenden Alterungsprozess verschiedener Hunderassen in die statistische Auswertung mit einbeziehen zu können, wurden nochmals vier Altersgruppen gebildet und in diesen jeweils die vier Gewichtsklassen verglichen.

Altersgruppe A: 0 bis 2 Jahre

Altersgruppe B: >2 Jahre bis 6 Jahre

Altersgruppe C: >6 Jahre bis <10 Jahre

Altersgruppe D: 10 Jahre und älter

Tabelle 5 gibt die Verteilung der Proben in den Altersgruppen A bis D und ihre Verteilung auf die Analysengeräte an.

Tabelle 5:

Alters- gruppe	Gewichts- klasse	Anzahl der Proben gesamt	Anzahl der Proben bestimmt mit Elektrophorese- gerät 1	Anzahl der Proben bestimmt mit Elektrophorese- gerät 2
A	1	30	29	23
A	2	46	44	40
A	3	46	46	42
A	4	13	13	11
B	1	32	31	23
B	2	43	41	33
B	3	57	57	47
B	4	16	16	15
C	1	17	16	16
C	2	32	32	24
C	3	23	22	21
C	4	7	7	6
D	1	14	13	13
D	2	18	18	14
D	3	11	11	8
D	4	1	1	1

3.2 Methodik

3.2.1 Probengewinnung und Probenaufbereitung

Die Blutentnahme erfolgte am stehenden oder liegenden Tier aus der V. cephalica antebrachii oder aus der V. saphena lateralis. Die Stauung der Vene erfolgte erst kurz vor der Blutentnahme um Verfälschungen zu verhindern. Das Blut lief frei in das Probengefäß. Es wurde ein mit Trennperlen versehenes 5-ml-Probengefäß der Firma Sarstedt verwendet. Die Proben wurden innerhalb der ersten Stunde nach der Blutentnahme bei 4000 U/min zentrifugiert, nachdem sie 20 min zur Koagulation stehen gelassen wurden.

War die Bearbeitung der Proben am Tag der Blutentnahme nicht möglich, wurden sie bei -18°C eingefroren. Zur über vierwöchigen Lagerung wurden die Proben bei -70°C tiefgefroren.

3.2.2 Labormethoden

Aus den Proben wurden Gesamtprotein, Albumin und die Globulinfraktionen bestimmt. Aus Albumin und den Globulinen wurde der Albumin-Globulin-Quotient (A/G) errechnet.

3.2.2.1 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Zur Analyse wurde ein Hitachi 717 Automatic Analyser von der Firma Boehringer Mannheim GmbH und die Testkombination TP von der Firma Roche benutzt. Die Messung erfolgte nach der Biuret-Methode, bei der die Peptidbindungen von Proteinen mit zweiwertigen Kupferionen in alkalischer Lösung zum charakteristischen purpurfarbenen Biuretkomplex reagieren. Die Farbintensität ist direkt zur Eiweißkonzentration proportional und wird photometrisch gemessen.

3.2.2.2 Bestimmung der Albuminkonzentration

Es wurde ebenfalls der Hitachi 717 Automatic Analyser verwendet. Als Laborreagenzien wurde ALB plus der Firma Roche benutzt. Die Messung beruht wiederum auf einer Komplexbildung. Albumin bildet bei einem pH-Wert von 4,1 mit Bromcresolgrün einen blaugrünen Komplex. Der pH-Wert von 4,1 wird durch Zugabe eines Citratpuffers erreicht. Die Farbintensität ist direkt zur Albuminkonzentration proportional und wird photometrisch gemessen.

3.2.2.3 Auftrennung der Proteinfractionen

Die Auftrennung der Proteinfractionen wurde mit der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese durchgeführt. 397 der 406 Proben wurden mit der Elpho-Mikro-Rapid-Kammer von der Firma Bender & Hobein getrennt, 337 Proben wurden mit dem Gerät Elphoscan Mini der Firma Hirschmann-Beiler gemessen. 328 Proben wurden mit beiden Geräten gemessen. Durch die Auftrennung wurden folgende Fraktionen bestimmt: Albumin, α_1 -Globuline, α_2 -Globuline, β -Globuline, γ -Globuline.

3.2.2.3.1 Auftrennung mit der Elpho-Mikro-Rapid-Kammer

Es handelt sich um ein halbautomatisches System. Vor Gebrauch muss die Trennkammer mit der Pufferlösung (pH-Wert 8,6) bis zur Eichmarke aufgefüllt werden. Drei OTB-Celluloseacetatfolien der Firma ELTEST GmbH (Breite 6,6 cm, Länge 15,0 cm) werden vor dem Auftragen mit dieser Pufferlösung befeuchtet. Die feuchten Folien werden auf der Brücke der Trennkammer eingespannt, und das Auftragen der Seren erfolgt nun manuell mit einem Stempel. Zuvor wurden 20 μ l Serum je Probe auf die Auftrageschablone pipettiert, die Platz für 24 Proben bietet. Somit können in einem Arbeitsdurchgang 24 Proben bearbeitet werden. Das Elpho-Vario-2-Netzanschlussgerät wird nun an die Trennkammer angeschlossen. Die Trennung erfolgt 23 min lang bei 240 V und 11 - 12 mA. Die Kathode liegt auf der Seite der Auftragsstelle des Serums. Nach Beendigung der Trennung werden die Acetatfolien manuell gefärbt (10 min in einer Ponceau-S-Lösung), entfärbt (3 mal 3 min mit einer Mischung aus Arylsulfon- und Hydroxycarboxylsäuren) und geklärt (1 min). Die Folien werden dann auf Objektträger aufgezogen und bei 100 °C 15 Minuten getrocknet. Die Auswertung erfolgt mit einem halbautomatischen Photometer mit eingebautem

Rechner (Elskript 1 der Firma Hirschmann). Die Objektträger mit den aufgezogenen Folien werden so auf die Messstrecke aufgelegt, dass eine Bande ausgewertet werden kann. Anfang und Ende der Messstrecke werden von Hand eingestellt. Die Extinktion der gefärbten Probe wird in einem Kurvenzug dargestellt. Nach manueller Eintragung der Trennmarken zwischen den Fraktionen, berechnet das Gerät die Prozentwerte der Fraktionen. Absolute Werte erhält man, indem der Gesamtproteinwert der Probe, der zuvor mit dem Hitachi-Analyser ermittelt worden ist, in den Rechner eingegeben wird. Die absoluten Werte werden nun aus den Prozentwerten in bezug zum Gesamtproteinwert ermittelt.

3.2.2.3.2 Auftrennung mit Elphoscan Mini

Es handelt sich hierbei um ein vollautomatisches System. Nach Auftragen des Serums (40 µl pro Probe) auf eine Schablone mit zehn Auftragsstellen laufen die nachfolgenden Schritte vollautomatisch ab: Auftragen des Serums auf die Acetatfolie, Trennen, Färben, Entfärben, Trocknen und Scannen der Extinktionskurven. Der Auftragestempel nimmt pro Probe 5 µl Serum auf und trägt diese auf der Celluloseacetatfolie der Firma ELTEST GmbH (6,5 cm breit, 11,0 cm lang) auf. Die Pufferlösung in der Trennkammer hat einen pH-Wert von 8,6. An die Trennkammer wird während des Trennvorgangs eine Spannung von 115 V angelegt, die Stromstärke beträgt 12 mA. Das Gerät garantiert eine stabile Spannung und Stromstärke. Der Trennvorgang ist nach 18 min abgeschlossen. Zum Färben wird eine Ponceau-S-Lösung und zum Entfärben eine Mischung aus Arylsulfon- und Hydroxycarboxylsäuren benutzt. Nachdem die Folie 15 Minuten getrocknet wurde, erfolgt der Scanvorgang. Am Ort maximaler optischer Dichte erfolgt eine densitometrische Messung mit einer Wellenlänge von 530 nm. Die Extinktionskurve mit den Werten der einzelnen Fraktionen erscheint auf dem Bildschirm. Die Trennmarken der Fraktionen werden vom Laboranten am Bildschirm gezogen. Die absoluten Werte werden ebenfalls aus dem mittels dem Hitachi-Analyser ermittelten Gesamtproteinwert bestimmt. Vom Gerät können fünf Peaks identifiziert werden (Albumin, α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globuline).

Alle verwendeten Chemikalien für beide Trennmethoden wurden von der Firma ELTEST GmbH hergestellt. Nachfolgend wird die Elpho-Mikro-Rapid-Kammer

als Elektrophoresegerät 1 und das Gerät Elphoscan Mini als Elektrophoresegerät 2 bezeichnet.

3.2.3 Qualitätskontrolle

Bei der Bestimmung des Gesamtproteins und des Albumins mit dem Hitachi-Analyser wurden täglich die Kontrollseren Precinorm U der Firma Roche Diagnostics oder Validate A von Organon Technika mitgeführt. Bei den elektrophoretischen Trennmethode wurden ebenfalls an jedem Arbeitstag Kontrollen mit einem oder beiden der genannten Kontrollseren durchgeführt. Die Ergebnisse der Kontrollseren lagen für alle Messungen im Vertrauensbereich. Die Vertrauensbereiche wurden bei den elektrophoretischen Methoden für die Fraktionen Albumin und γ -Globuline überprüft.

3.2.4 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS 10.00 durchgeführt. Tabellen und Diagramme sind zum Teil mit dem Programm Excel 97 erstellt worden.

Die Beziehung zwischen Alter und den einzelnen untersuchten Parametern (Gesamtprotein, Albumin, α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globulinen, Albumin-Globulin-Quotient) wurde durch eine Korrelationsanalyse anhand des Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten r_s beurteilt. Zur näheren Beschreibung dieser Korrelationen wurden die Mittelwerte errechnet, diese graphisch dargestellt und ihr Verlauf mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney statistisch untersucht.

Die vergleichenden Untersuchungen der vier Gewichtsklassen innerhalb verschiedener Altersgruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

Der Vergleich der Analysengeräte wurde ebenfalls mit einer Korrelationsanalyse durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse als schwach signifikant, wenn $0,01 < p \leq 0,05$, als signifikant, wenn $0,001 < p \leq 0,01$ und hoch signifikant, wenn $p \leq 0,001$ ist, bezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Die Abhängigkeit der untersuchten Parameter vom Alter

4.1.1 Korrelation der Parameter mit dem Alter

Die Korrelationsanalyse nach Spearman ergibt, dass alle Parameter mit dem Alter korreliert sind. Die Abhängigkeit vom Alter ist mit $p \leq 0,01$ für alle untersuchten Parameter signifikant. Die Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Korrelation der Parameter mit dem Alter

Parameter	Korrelationskoeffizient r_s	Signifikanzniveau $p \leq$	Anzahl der Proben
Gesamtprotein g/l	0,496	0,01	406
Albumin g/l Hitachi	0,210	0,01	406
α_1 -Globuline g/l Gerät 1	-0,204	0,01	397
α_1 -Globuline % Gerät 1	-0,325	0,01	397
α_2 -Globuline g/l Gerät 1	0,447	0,01	397
α_2 -Globuline % Gerät 1	0,310	0,01	397
β -Globuline g/l Gerät 1	0,535	0,01	397
β -Globuline % Gerät 1	0,350	0,01	397
γ -Globuline g/l Gerät 1	0,498	0,01	397
γ -Globuline % Gerät 1	0,461	0,01	397
Albumin g/l Gerät 1	0,194	0,01	397
Albumin % Gerät 1	-0,464	0,01	397
A/G-Quotient Gerät 1	-0,462	0,01	397
α_1 -Globuline g/l Gerät 2	-0,288	0,01	337
α_1 -Globuline % Gerät 2	-0,445	0,01	337
α_2 -Globuline g/l Gerät 2	0,326	0,01	337
α_2 -Globuline % Gerät 2	0,170	0,01	337
β -Globuline g/l Gerät 2	0,566	0,01	337
β -Globuline % Gerät 2	0,408	0,01	337
γ -Globuline g/l Gerät 2	0,467	0,01	337
γ -Globuline % Gerät 2	0,385	0,01	337
Albumin g/l Gerät 2	0,291	0,01	337
Albumin % Gerät 2	-0,407	0,01	337
A/G-Quotient Gerät 2	-0,406	0,01	337

Aus Tabelle 6 geht hervor, dass sich die Korrelationen für die einzelnen Parameter wie folgt verhalten:

4.1.1.1 Gesamtprotein

Es liegt eine positive Korrelation zwischen Gesamtprotein und Alter vor ($r_s = 0,496$).

4.1.1.2 Albumin

Für das absolut bestimmte Albumin in g/l liegt eine positive Korrelation zwischen Albumin und Alter vor. Dieses Ergebnis erhält man sowohl bei den mit dem Hitachi-Analyser ($r_s = 0,210$) ermittelten Werten als auch bei der elektrophoretischen Trennung mit der Elphor-Mikro-Rapidkammer ($r_s = 0,194$) und mit Elphoscan ($r_s = 0,291$).

Das prozentual bestimmte Albumin ist negativ mit dem Alter korreliert. Dies ergibt sich bei beiden Elektrophoresegeräten (Gerät 1: $r_s = -0,464$; Gerät 2: $r_s = -0,407$).

4.1.1.3 α_1 -Globuline

Die absoluten α_1 -Globulinwerte (Gerät 1: $r_s = -0,204$; Gerät 2: $r_s = -0,288$) und die relativen α_1 -Globulinwerte (Gerät 1: $r_s = -0,325$; Gerät 2: $r_s = -0,445$) sind bei beiden Analysengeräten negativ mit dem Alter korreliert.

4.1.1.4 α_2 -, β - und γ -Globuline

Für die drei Fraktionen besteht eine positive Korrelation mit dem Alter für die relativen und absoluten Werte bei beiden Geräten.

α_2 -Globuline: absolute Werte Gerät 1: $r_s = 0,447$; Gerät 2: $r_s = 0,326$

relative Werte Gerät 1: $r_s = 0,310$; Gerät 2: $r_s = 0,170$

β -Globuline: absolute Werte Gerät 1: $r_s = 0,535$; Gerät 2: $r_s = 0,566$

relative Werte Gerät 1: $r_s = 0,350$; Gerät 2: $r_s = 0,408$

γ -Globuline: absolute Werte Gerät 1: $r_s = 0,498$; Gerät 2: $r_s = 0,467$

relative Werte Gerät 1: $r_s = 0,461$; Gerät 2: $r_s = 0,385$

4.1.1.5 Albumin-Globulin-Quotient (A/G)

Der Albumin-Globulin-Quotient ist bei beiden Elektrophoresemethoden negativ mit dem Alter korreliert (Gerät 1: $r_s = -0,462$; Gerät 2: $r_s = -0,406$).

4.1.2 Verlauf der Parameter in Abhängigkeit vom Alter

Wie aus dem vorhergehenden Abschnitt hervorgeht, besteht eine signifikante Altersabhängigkeit für alle bestimmten Parameter auf dem 1%-Niveau. Um den Verlauf der Parameter mit zunehmendem Alter näher zu untersuchen, werden die Mittelwerte und die Standardabweichungen von neun Altersgruppen errechnet und graphisch dargestellt. Mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney werden die Altersgruppen auf statistisch relevante Unterschiede untersucht. Die Ergebnisse des U-Tests werden nach Bonferroni korrigiert. Der Kruskal-Wallis-Test untersucht, ob in einer Gruppe von Stichproben (in diesem Fall zwischen den Altersgruppen) signifikante Unterschiede vorhanden sind. Der U-Test vergleicht die Gruppen paarweise.

4.1.2.1 Gesamtprotein

Tabelle 7: Gesamtprotein g/l

Alters- gruppe	Alter	Mittelwert (g/l)	Standardab- weichung
1	0 bis 6 Wochen	45,5	1,55
2	>6 Wochen bis 4 Monate	51,7	3,08
3	>4 bis 6 Monate	54,8	4,89
4	>6 bis 12 Monate	58,8	4,92
5	>1 bis 2 Jahre	62,4	4,50
6	>2 bis 5 Jahre	63,8	4,97
7	>5 bis 8 Jahre	64,1	4,66
8	>8 bis 10 Jahre	65,3	4,42
9	>10 Jahre	66,1	4,40

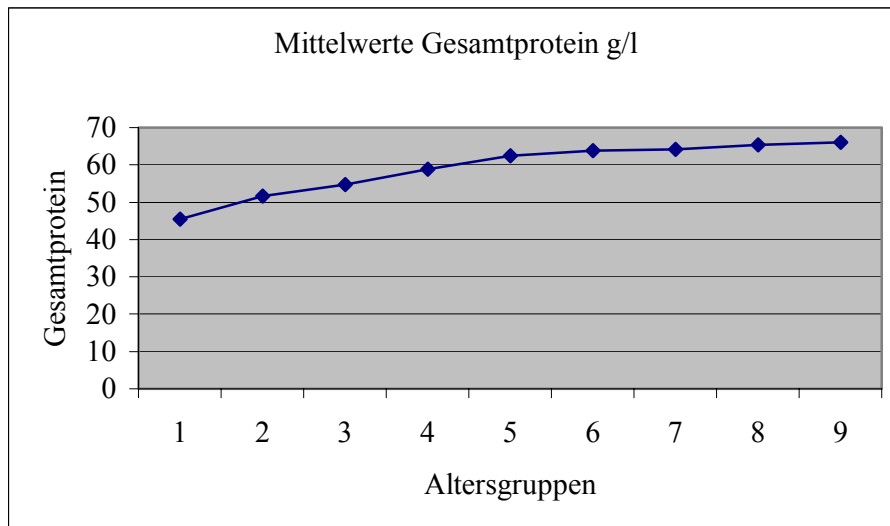


Abbildung 4: Verlauf der Mittelwerte des Gesamtproteins (g/l)

Das Gesamtprotein zeigt in Abbildung 4 eine lebenslange Zunahme. Der Anstieg ist bis Altersgruppe 5 stärker ausgeprägt als von Altersgruppe 6 bis 9.

Der Kruskal-Wallis-Test ergibt für den Vergleich der Altersgruppen 1 bis 5 ($p < 0,0001$) und der Altersgruppen 5 bis 9 ($p < 0,001$) hoch signifikante Unterschiede. Für die Altersgruppen 1 und 5 und die Altersgruppen 5 und 9 sind die Unterschiede im nach Bonferroni korrigierten U-Test ebenfalls hoch signifikant ($p < 0,0001$).

4.1.2.2 Albumin

Tabelle 8: Albumin (g/l), bestimmt mit dem Hitachi-Analyser

Altersgruppe	Alter	Mittelwert (g/l)	Standardabweichung
1	0 bis 6 Wochen	30,0	1,81
2	>6 Wochen bis 4 Monate	32,7	2,42
3	>4 bis 6 Monate	34,1	1,98
4	>6 bis 12 Monate	35,6	2,74
5	>1 bis 2 Jahre	36,8	3,15
6	>2 bis 5 Jahre	37,0	3,13
7	>5 bis 8 Jahre	35,9	2,90
8	>8 bis 10 Jahre	36,9	3,46
9	>10 Jahre	36,8	3,26

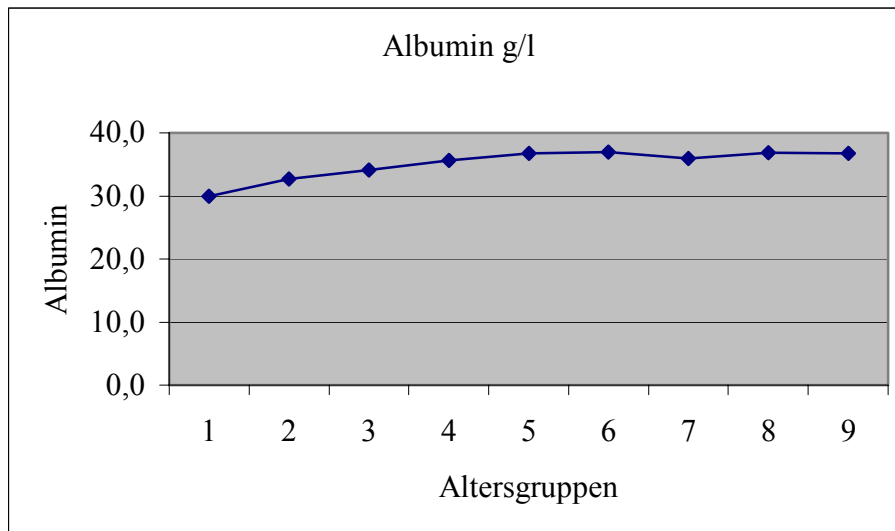


Abbildung 5: Verlauf der Mittelwerte des Albumins (g/l), bestimmt mit dem Hitachi-Analyser

Der in Abbildung 5 dargestellte Kurvenverlauf zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der Albuminwerte bis Altersgruppe 5. Dann bleiben die Werte bis auf ein leichtes Absinken der Altersgruppe 7 annähernd gleich. Der Vergleich der Altersgruppen 5 bis 9 ergibt mit dem Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$), der Vergleich der Altersgruppen 4 bis 9 ist mit $p < 0,05$ dagegen schwach signifikant unterschiedlich. Für die Altersgruppen 1 bis 5 sind die Unterschiede mit diesem Test hoch signifikant ($p < 0,0001$). Der Vergleich von Altersgruppe 1 und 5 ergibt im U-Test mit $p < 0,0001$ ein hoch signifikantes Ergebnis. Zwischen Altersgruppe 1 und Altersgruppe 5 steigen die Werte also signifikant an. Danach sind keine signifikanten Veränderungen nachweisbar.

Tabelle 9: Albumin, bestimmt mit Elektrophoresegerät 1

Alters- gruppe	Alter	Mittelwert (g/l)	Mittelwert (%)	Standard- abweichung (g/l)	Standard- abweichung (%)
1	0 bis 6 Wochen	32,0	70,3	1,12	1,67
2	>6 Wochen bis 4 Monate	35,4	68,5	1,81	3,57
3	>4 bis 6 Monate	36,7	67,2	2,71	2,85
4	>6 bis 12 Monate	39,8	68,0	4,03	5,50
5	>1 bis 2 Jahre	41,5	66,7	3,65	4,72
6	>2 bis 5 Jahre	42,1	66,2	3,57	4,41
7	>5 bis 8 Jahre	40,6	63,4	3,63	4,01
8	>8 bis 10 Jahre	40,8	62,3	4,10	5,02
9	>10 Jahre	40,7	61,5	3,71	4,07

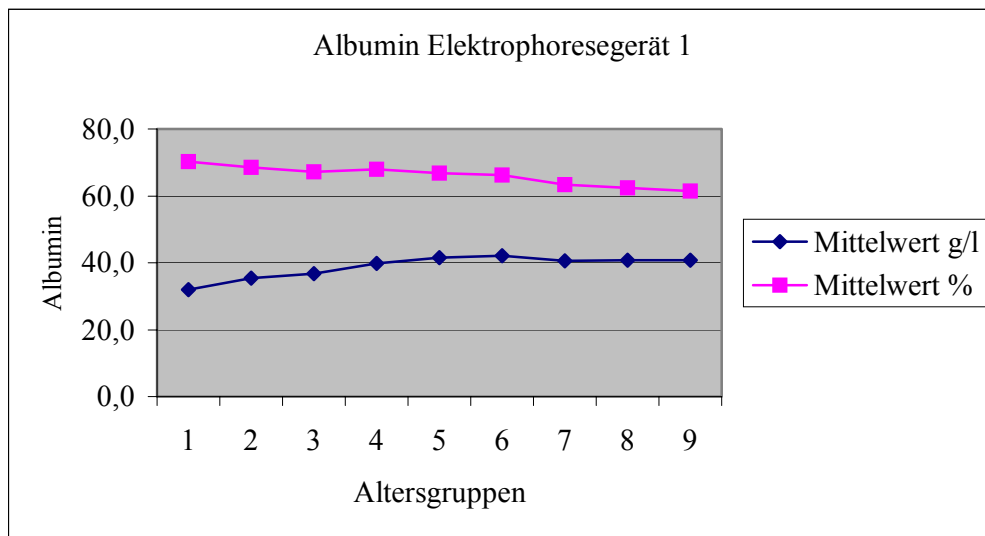


Abbildung 6: Verlauf der Mittelwerte des Albumins, bestimmt mit Elektrophoresegerät 1

Absolute Albuminwerte, bestimmt mit Elektrophoresegerät 1:

Der Kurvenverlauf der absoluten Mittelwerte zeigt bis einschließlich Altersgruppe 6 einen Anstieg. Zwischen Altersgruppe 6 und 7 kommt es zu einem leichten Abfall der Werte. Danach bleiben die Werte annähernd gleich.

Zwischen den Altersgruppen 1 bis 6 erhält man im Kruskal-Wallis-Test hoch signifikante ($p < 0,0001$) Unterschiede. Die Unterschiede zwischen den Altersgruppen 7 bis 9 sind mit $p > 0,05$ nicht signifikant. Vergleicht man Altersgruppe 1 und 6 im U-Test, so ist das Ergebnis hoch signifikant ($p < 0,0001$).

Relative Albuminwerte, bestimmt mit Elektrophoresegerät 1:

Die relativen Werte, bezogen auf das Gesamtprotein, zeigen in Abbildung 6 hingegen einen Abfall von Gruppe 1 bis Gruppe 9.

Im Kruskal-Wallis-Test ergibt sich für die Altersgruppen 1 bis 5 mit $p > 0,05$ kein signifikantes Ergebnis. Für die Altersgruppen 1 bis 6 ist das Ergebnis mit $p < 0,05$ schwach signifikant. Hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$) bestehen zwischen den Altersgruppen 5 bis 9. Die Altersgruppen 5 und 9 unterscheiden sich im U-Test hoch signifikant ($p < 0,0001$). Die Werte sinken zwischen Altersgruppe 5 und Altersgruppe 9 signifikant ab. Zuvor verändern sie sich nicht signifikant.

Tabelle 10: Albumin, bestimmt mit Elektrophoresegerät 2

Alters- gruppe	Alter	Mittelwert (g/l)	Mittelwert (%)	Standard- abweichung (g/l)	Standard- abweichung (%)
1	0 bis 6 Wochen	30,5	67,2	1,34	2,67
2	>6 Wochen bis 4 Monate	31,5	61,5	1,31	2,95
3	>4 bis 6 Monate	32,9	60,1	3,77	4,15
4	>6 bis 12 Monate	35,9	61,5	3,20	3,64
5	>1 bis 2 Jahre	37,6	60,0	3,39	4,07
6	>2 bis 5 Jahre	37,2	58,7	3,38	4,65
7	>5 bis 8 Jahre	37,0	58,1	3,36	3,99
8	>8 bis 10 Jahre	37,2	57,3	2,99	3,94
9	>10 Jahre	37,4	56,2	3,38	3,20

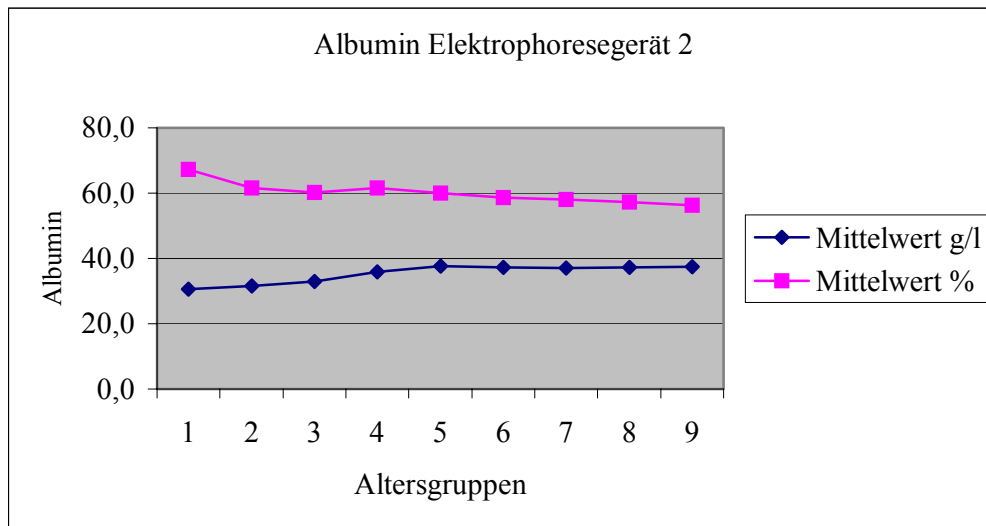


Abbildung 7: Verlauf der Mittelwerte des Albumins, bestimmt mit Elektrophoresegerät 2

Absolute Albuminwerte, bestimmt mit Elektrophoresegerät 2:

Im Verlauf der Mittelwerte ist ein Anstieg bis zu Altersgruppe 5 ersichtlich. Dann fallen die Werte bis zu Altersgruppe 7 sehr leicht ab und steigen danach wiederum sehr leicht an.

Der Kruskal-Wallis-Test liefert für Altersgruppe 1 bis 4 hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$). Zwischen den Altersgruppen 4 bis 9 sind die Unterschiede nicht signifikant ($p > 0,05$), zwischen den Altersgruppen 3 bis 9 sind signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) nachweisbar. Das Resultat des U-Tests ist für Altersgruppen 1 und 4 hoch signifikant ($p < 0,0001$). Zwischen den Altersgruppen

1 und 4 steigen die Werte signifikant ($p < 0,0001$) an. Danach sind die Veränderungen nicht signifikant.

Relative Albuminwerte, bestimmt mit Elektrophoresegerät 2:

Der Abfall der relativen Mittelwerte ist zwischen Altersgruppe 1 und 2 deutlich ausgeprägt. Danach fallen die Werte langsam weiter ab. Bei Altersgruppe 4 zeigt sich ein kurzfristiger, geringfügiger Anstieg. Im Kruskal-Wallis-Test ergeben sich sowohl für die Altersgruppen 1 bis 5 ($p < 0,0001$) als auch für die Altersgruppen 5 bis 9 ($p \leq 0,001$) hoch signifikante Unterschiede. Ebenso verhalten sich die Unterschiede zwischen Altersgruppe 1 und 5 ($p < 0,0001$) und Altersgruppe 5 und 9 ($p < 0,0001$) im nach Bonferroni korrigierten U-Test. Der Abfall der Werte ist zwischen den Altersgruppen 1 und 5 und zwischen den Altersgruppen 5 und 9 signifikant ($p < 0,0001$) nachweisbar.

4.1.2.3 α_1 -Globuline

Tabelle 11: α_1 -Globuline, bestimmt mit Elektrophoresegerät 1

Alters- gruppe	Alter	Mittelwert (g/l)	Mittelwert (%)	Standard- abweichung (g/l)	Standard- abweichung (%)
1	0 bis 6 Wochen	3,7	8,1	0,42	0,83
2	>6 Wochen bis 4 Monate	3,2	6,2	0,67	1,26
3	>4 bis 6 Monate	3,3	6,0	0,68	1,00
4	>6 bis 12 Monate	2,4	4,2	0,74	1,27
5	>1 bis 2 Jahre	2,2	3,6	0,39	0,64
6	>2 bis 5 Jahre	2,2	3,5	0,56	0,82
7	>5 bis 8 Jahre	2,3	3,5	0,50	0,76
8	>8 bis 10 Jahre	2,4	3,7	0,65	0,94
9	>10 Jahre	2,3	3,5	0,57	0,79

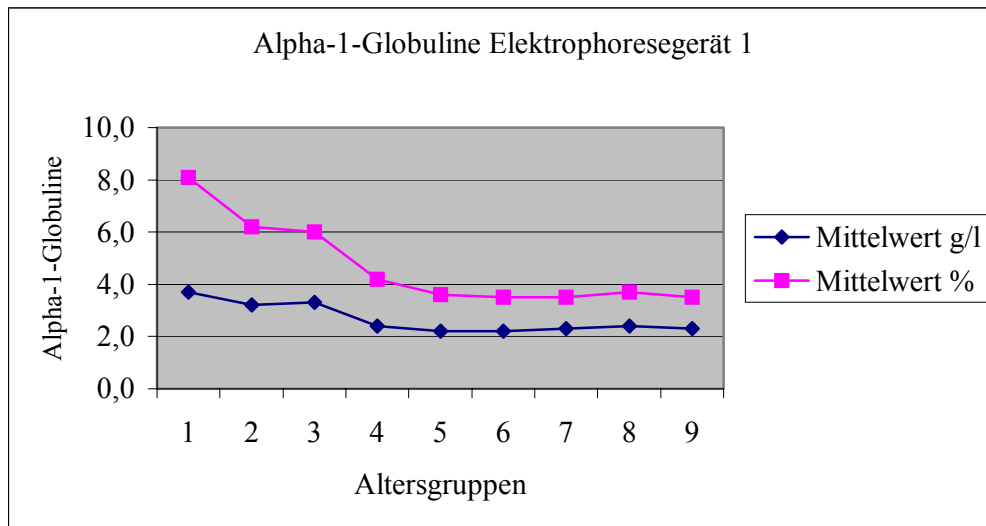


Abbildung 8: Verlauf der Mittelwerte der α_1 -Globuline, bestimmt mit Elektrophoresegerät 1

Tabelle 12: α_1 -Globuline, bestimmt mit Elektrophoresegerät 2

Alters- gruppe	Alter	Mittelwert (g/l)	Mittelwert (%)	Standard- abweichung (g/l)	Standard- abweichung (%)
1	0 bis 6 Wochen	4,1	8,9	0,37	0,57
2	>6 Wochen bis 4 Monate	4,3	8,4	0,95	1,74
3	>4 bis 6 Monate	4,3	7,8	0,88	1,34
4	>6 bis 12 Monate	3,4	5,9	0,65	1,10
5	>1 bis 2 Jahre	3,2	5,1	0,68	1,11
6	>2 bis 5 Jahre	3,3	5,2	0,75	1,11
7	>5 bis 8 Jahre	3,1	4,8	0,56	0,85
8	>8 bis 10 Jahre	3,3	5,1	0,62	0,94
9	>10 Jahre	3,2	4,7	0,67	0,94

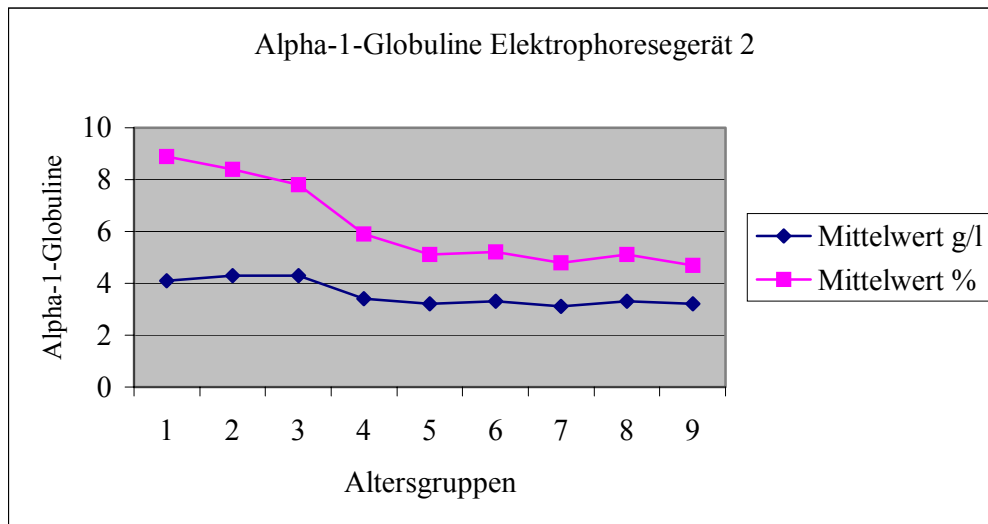


Abbildung 9: Verlauf der Mittelwerte der α_1 -Globuline, bestimmt mit Elektrophoresegerät 2

Absolute α_1 -Globulinwerte:

Die absoluten Mittelwerte dieser Fraktion fallen bei Elektrophoresegerät 1 bis Altersgruppe 5 ab und bleiben dann annähernd gleich. Bei Elektrophoresegerät 2 ist bis Altersgruppe 3 fast keine Veränderung zu verzeichnen. Zwischen Altersgruppe 3 und 5 fallen die Werte ab. Danach sind sie annähernd konstant.

Im Kruskal-Wallis-Test ergeben sich zwischen den Altersgruppen 4 bis 9 mit $p > 0,05$ keine signifikanten Unterschiede. Zwischen den Altersgruppen 3 bis 9 bestehen in diesem Test hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$), ebenso wie zwischen den Altersgruppen 1 bis 4 ($p \leq 0,001$). Beim Vergleich der Altersgruppen 1 und 4 liefert der U-Test ein hoch signifikantes Resultat ($p < 0,0001$) für Elektrophoresegerät 1 und ein signifikantes Resultat für Elektrophoresegerät 2 ($p < 0,01$). Alle anderen Ergebnisse sind bei beiden Elektrophoresegeräten gleich. Zwischen den Altersgruppen 1 und 4 fallen die Werte signifikant ab und unterscheiden sich danach nicht mehr signifikant.

Relative α_1 -Globulinwerte:

Die Kurven beider Geräte (vgl. Abb. 8 und 9) sinken bis Altersgruppe 5 ab und zeigen dann kaum noch Veränderungen.

Im Kruskal-Wallis-Test ergeben sich für die Altersgruppen 1 bis 5 hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$). Für die Altersgruppen 5 bis 9 sind die Unterschiede nicht signifikant ($p > 0,05$). Zwischen den Altersgruppen 4 bis 9

bestehen wiederum signifikante Unterschiede ($p < 0,05$ für Elektrophoresegerät 1), die bei Elektrophoresegerät 2 mit $p < 0,0001$ hoch signifikant sind. Die Altersgruppen 1 und 5 unterscheiden sich im U-Test hoch signifikant ($p < 0,0001$). Die Resultate sind bis auf die aufgeführte Ausnahme für beide Geräte gültig. Zwischen Altersgruppe 1 und 5 fallen die Werte signifikant ab und unterscheiden sich danach nicht mehr signifikant.

4.1.2.4 α_2 -Globuline

Tabelle 13: α_2 -Globuline, bestimmt mit Elektrophoresegerät 1

Alters- gruppe	Alter	Mittelwert (g/l)	Mittelwert (%)	Standard- abweichung (g/l)	Standard- abweichung (%)
1	0 bis 6 Wochen	2,5	5,6	0,35	0,81
2	>6 Wochen bis 4 Monate	2,9	5,7	0,54	1,00
3	>4 bis 6 Monate	3,3	6,0	0,62	1,09
4	>6 bis 12 Monate	3,8	6,3	1,47	2,19
5	>1 bis 2 Jahre	3,6	5,8	1,10	1,61
6	>2 bis 5 Jahre	3,7	5,8	1,16	1,60
7	>5 bis 8 Jahre	4,4	7,0	1,32	2,05
8	>8 bis 10 Jahre	4,8	7,3	1,54	2,20
9	>10 Jahre	5,1	7,7	1,26	1,77

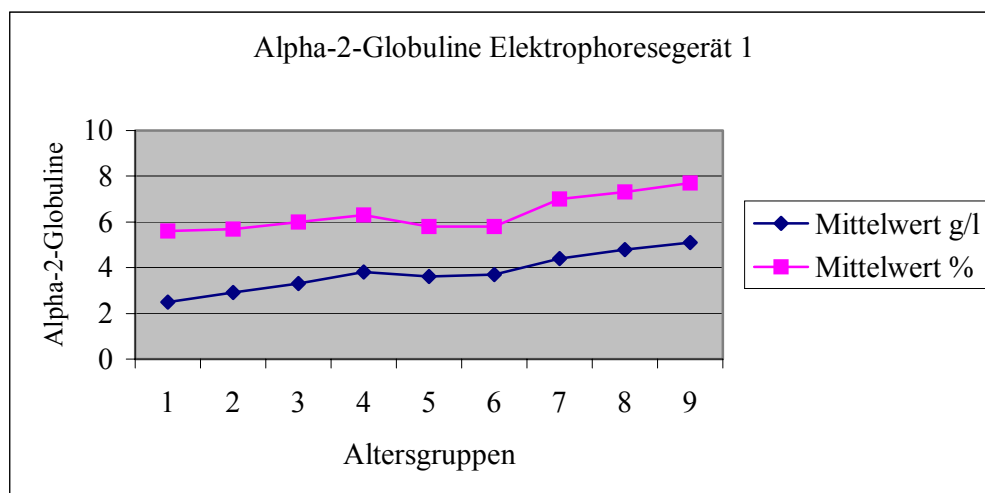
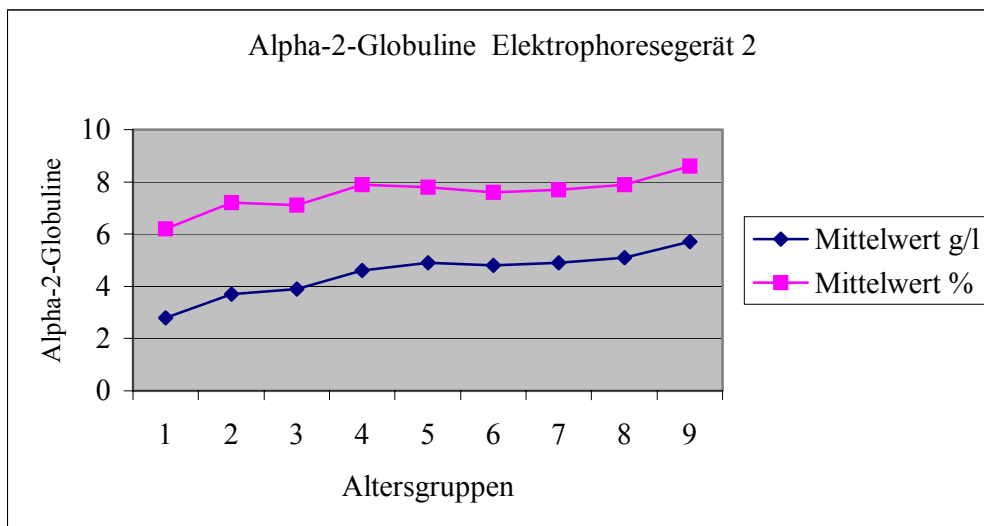


Abbildung 10: Verlauf der Mittelwerte der α_2 -Globuline, bestimmt mit Elektrophoresegerät 1

Tabelle 14: α_2 -Globuline, bestimmt mit Elektrophoresegerät 2

Alters- gruppe	Alter	Mittelwert (g/l)	Mittelwert (%)	Standard- abweichung (g/l)	Standard- abweichung (%)
1	0 bis 6 Wochen	2,8	6,2	0,39	0,82
2	>6 Wochen bis 4 Monate	3,7	7,2	0,78	1,48
3	>4 bis 6 Monate	3,9	7,1	0,97	1,83
4	>6 bis 12 Monate	4,6	7,9	1,44	2,22
5	>1 bis 2 Jahre	4,9	7,8	1,16	1,80
6	>2 bis 5 Jahre	4,8	7,6	1,37	1,96
7	>5 bis 8 Jahre	4,9	7,7	1,34	2,06
8	>8 bis 10 Jahre	5,1	7,9	1,49	2,20
9	>10 Jahre	5,7	8,6	1,18	1,61

Abbildung 11: Verlauf der Mittelwerte der α_2 -Globuline, bestimmt mit Elektrophoresegerät 2

Absolute α_2 -Globulinwerte:

In Abbildung 10 steigen die Werte bis Altersgruppe 4 langsam an, sinken bis Altersgruppe 6 minimal ab und nehmen danach wieder stetig zu. In Abbildung 11 erfolgt der Anstieg bis Altersgruppe 5, dann verändern sich die Werte bis Altersgruppe 7 nur minimal und steigen danach wieder an.

Die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests lauten für Elektrophoresegerät 1: Altersgruppe 1 bis 4 $p < 0,01$ (signifikant), Altersgruppe 4 bis 6 $p > 0,05$ (nicht signifikant), Altersgruppe 6 bis 9 $p < 0,0001$ (hoch signifikant). Für Elektrophoresegerät 2 ergaben sie sich wie folgt: Altersgruppe 1 bis 5 $p < 0,0001$

(hoch signifikant), Altersgruppe 5 bis 7 $p > 0,05$ (nicht signifikant), Altersgruppe 7 bis 9 $p < 0,05$ (schwach signifikant).

Im nach Bonferroni korrigierten U-Test besteht zwischen Altersgruppe 1 und 4 mit $p < 0,05$ ein schwach signifikanter Unterschied und zwischen Altersgruppe 6 und 9 mit $p < 0,0001$ ein hoch signifikanter Unterschied bei Elektrophoresegerät 1. Bei Elektrophoresegerät 2 unterscheiden sich mit diesem Test Altersgruppe 1 und 5 hoch signifikant ($p < 0,0001$) und Altersgruppe 7 und 9 schwach signifikant ($p < 0,05$). Zwischen den Altersgruppen 1 und 4 steigen die Werte bei Elektrophoresegerät 1 signifikant an, zeigen dann bis Altersgruppe 6 keine signifikanten Veränderungen mehr und nehmen zwischen den Altersgruppen 6 und 9 nochmals signifikant zu. Die Ergebnisse von Elektrophoresegerät 2 unterscheiden sich dadurch, dass die Grenzen für die signifikanten Anstiege bei Altersgruppe 5 und 7 liegen.

Relative α_2 -Globulinwerte:

Der Kurvenverlauf der relativen Werte von Elektrophoresegerät 1 ist fast parallel zu dem der absoluten Werte. Die mit Elektrophoresegerät 2 bestimmten relativen Werte steigen bis Altersgruppe 4 an, bleiben dann bis Altersgruppe 8 fast gleich und steigen danach wieder an.

Für die relativen Werte lassen sich bei Elektrophoresegerät 1 nur zwischen den Altersgruppen 6 bis 9 statistische Unterschiede nachweisen (Kruskal-Wallis-Test: Altersgruppe 1 bis 6 $p > 0,05$; Altersgruppe 6 bis 9 $p < 0,0001$; Altersgruppe 1 bis 7 $p < 0,001$; korrigierter U-Test: Altersgruppe 6 und 9 $p < 0,0001$). Bei Elektrophoresegerät 2 fällt der Kruskal-Wallis-Test beim Vergleich der Altersgruppen 1 bis 9 schwach signifikant aus ($p < 0,05$). Der U-Test ergibt beim Vergleich von Altersgruppe 1 und 9 ein hoch signifikantes Ergebnis ($p < 0,0001$). Bei Elektrophoresegerät 1 steigen die Werte nur zwischen den Altersgruppen 6 und 9 signifikant an, bei Elektrophoresegerät 2 hingegen zwischen den Altersgruppen 1 und 9.

4.1.2.5 β -GlobulineTabelle 15: β -Globuline, bestimmt mit Elektrophoresegerät 1

Alters- gruppe	Alter	Mittelwert (g/l)	Mittelwert (%)	Standard- abweichung (g/l)	Standard- abweichung (%)
1	0 bis 6 Wochen	6,7	14,6	0,82	1,31
2	>6 Wochen bis 4 Monate	8,5	16,2	1,57	2,25
3	>4 bis 6 Monate	9,0	16,3	1,39	1,28
4	>6 bis 12 Monate	9,1	15,6	1,60	2,44
5	>1 bis 2 Jahre	10,3	16,5	1,79	2,31
6	>2 bis 5 Jahre	10,6	16,6	2,03	2,42
7	>5 bis 8 Jahre	11,4	17,8	1,90	2,48
8	>8 bis 10 Jahre	11,9	18,1	1,84	2,58
9	>10 Jahre	12,4	18,7	1,68	2,38

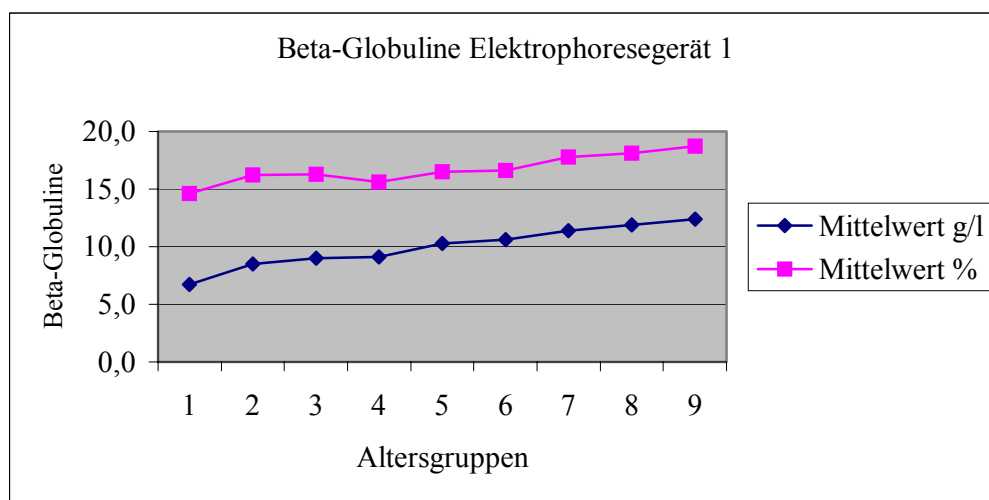
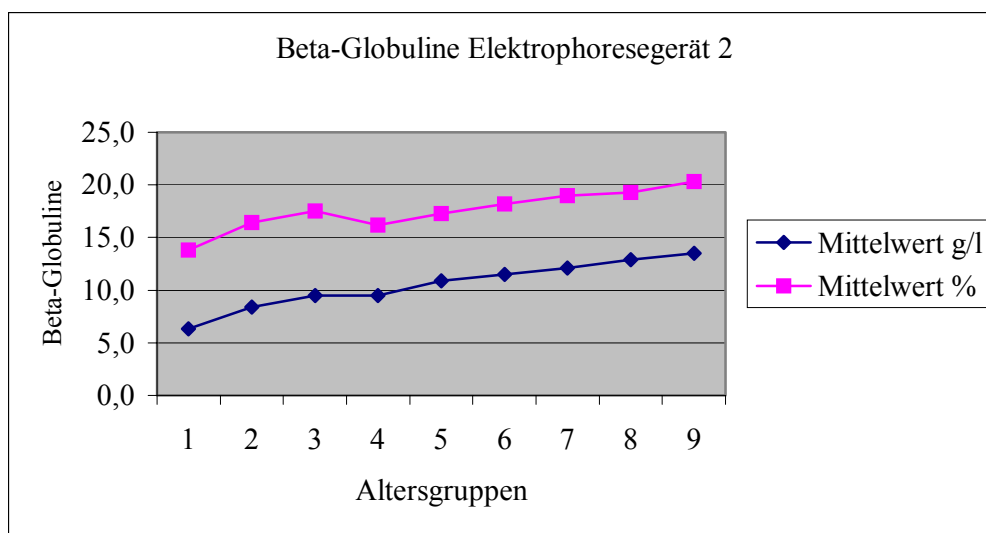
Abbildung 12: Verlauf der Mittelwerte der β -Globuline, bestimmt mit Elektrophoresegerät 1

Tabelle 16: β -Globuline, bestimmt mit Elektrophoresegerät 2

Alters- gruppe	Alter	Mittelwert (g/l)	Mittelwert (%)	Standard- abweich- ung (g/l)	Standard- abweichung (%)
1	0 bis 6 Wochen	6,3	13,8	0,99	1,99
2	>6 Wochen bis 4 Monate	8,4	16,4	1,36	2,14
3	>4 bis 6 Monate	9,5	17,5	1,79	3,16
4	>6 bis 12 Monate	9,5	16,2	1,53	2,37
5	>1 bis 2 Jahre	10,9	17,3	1,96	2,62
6	>2 bis 5 Jahre	11,5	18,2	2,39	3,01
7	>5 bis 8 Jahre	12,1	19,0	2,29	3,07
8	>8 bis 10 Jahre	12,9	19,3	2,57	2,94
9	>10 Jahre	13,5	20,3	1,61	2,06

Abbildung 13: Verlauf der Mittelwerte der β -Globuline, bestimmt mit Elektrophoresegerät 2

Absolute β -Globulinwerte:

Die Mittelwerte steigen in den Graphiken lebenslang an. Bei beiden Geräten bleiben die Werte von Altersgruppe 3 und 4 allerdings annähernd gleich.

Beim Vergleich der Altersgruppen 1 bis 3 ($p \leq 0,001$) und der Altersgruppen 4 bis 9 ($p < 0,0001$) im Kruskal-Wallis-Test ergeben sich bei beiden Geräten hoch signifikante Unterschiede. Im nach Bonferroni korrigierten U-Test sind die Ergebnisse bei beiden Geräten wie folgt: die Altersgruppen 1 und 3 und die Altersgruppen 4 und 9 unterscheiden sich mit $p < 0,0001$ hoch signifikant, die Altersgruppen 3 und 4 unterscheiden sich nicht signifikant ($p > 0,05$).

Relative β -Globulinwerte:

Bei beiden Messmethoden steigen die Werte, wie aus den Abbildungen 12 und 13 ersichtlich, lebenslang an. Zwischen Altersgruppe 3 und 4 kommt es zu einem kurzfristigen, schwachen Abfall der Werte. Mit dem Kruskal-Wallis-Test werden zwischen den Altersgruppen 1 bis 3 signifikante Unterschiede ($p < 0,01$ für Elektrophoresegerät 2; $p < 0,05$ für Elektrophoresegerät 1) und zwischen den Altersgruppen 4 bis 9 hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$ für beide Geräte) gefunden. Im nach Bonferroni korrigierten U-Test unterscheiden sich Altersgruppe 1 und 3 ($p < 0,05$) schwach signifikant und Altersgruppe 4 und 9 ($p < 0,0001$) hoch signifikant. Die Altersgruppen 3 und 4 unterscheiden sich hingegen nicht signifikant ($p > 0,05$). Diese Resultate gelten für beide Geräte.

Die absoluten und relativen Werte steigen also zwischen den Altersgruppen 1 und 3 und zwischen den Altersgruppen 4 und 9 signifikant an.

4.1.2.6 γ -GlobulineTabelle 17: γ -Globuline, bestimmt mit Elektrophoresegerät 1

Alters- gruppe	Alter	Mittelwert (g/l)	Mittelwert (%)	Standard- abweichung (g/l)	Standard- abweichung (%)
1	0 bis 6 Wochen	0,7	1,4	0,14	0,35
2	>6 Wochen bis 4 Monate	1,8	3,4	0,78	1,35
3	>4 bis 6 Monate	2,6	4,6	0,87	1,28
4	>6 bis 12 Monate	3,6	6,0	1,43	2,26
5	>1 bis 2 Jahre	4,7	7,3	1,55	2,30
6	>2 bis 5 Jahre	5,1	7,9	1,52	2,20
7	>5 bis 8 Jahre	5,4	8,3	1,55	2,11
8	>8 bis 10 Jahre	6,0	8,6	2,58	2,66
9	>10 Jahre	5,7	8,5	1,65	2,41

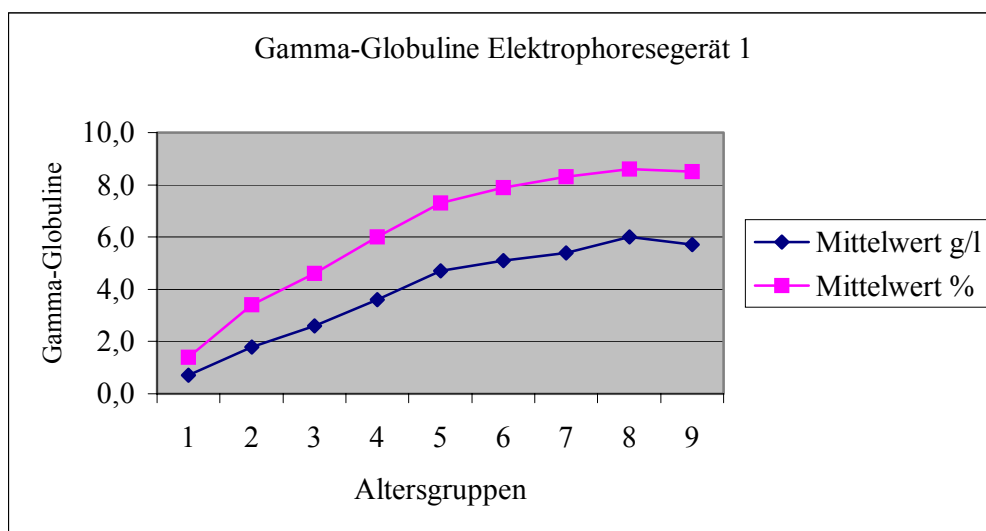
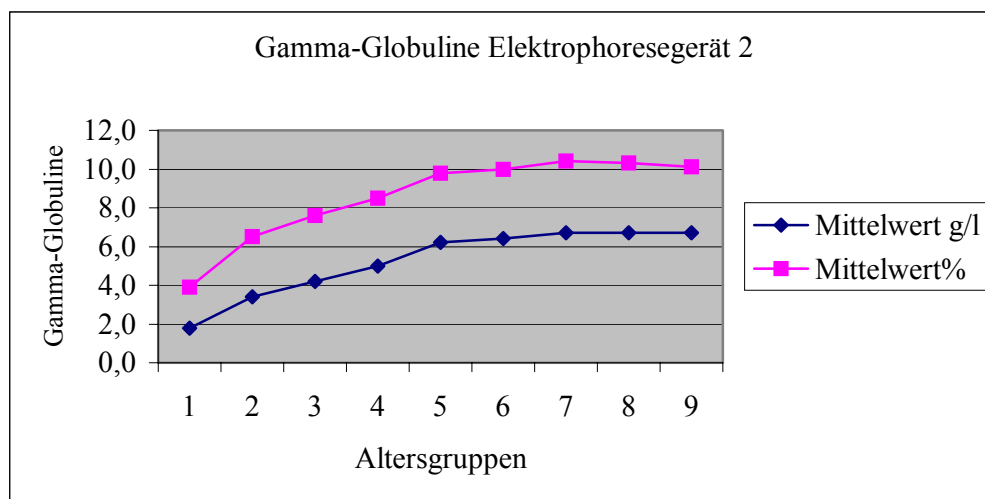
Abbildung 14: Verlauf der Mittelwerte der γ -Globuline, bestimmt mit Elektrophoresegerät 1

Tabelle 18: γ -Globuline, bestimmt mit Elektrophoresegerät 2

Alters- gruppe	Alter	Mittelwert (g/l)	Mittelwert (%)	Standard- abweichung (g/l)	Standard- abweichung (%)
1	0 bis 6 Wochen	1,8	3,9	0,27	0,64
2	>6 Wochen bis 4 Monate	3,4	6,5	1,08	1,77
3	>4 bis 6 Monate	4,2	7,6	1,15	1,90
4	>6 bis 12 Monate	5,0	8,5	1,02	1,52
5	>1 bis 2 Jahre	6,2	9,8	1,51	2,05
6	>2 bis 5 Jahre	6,4	10,0	1,54	2,02
7	>5 bis 8 Jahre	6,7	10,4	1,55	2,07
8	>8 bis 10 Jahre	6,7	10,3	1,94	2,64
9	>10 Jahre	6,7	10,1	1,32	1,87

Abbildung 15: Verlauf der Mittelwerte der γ -Globuline, bestimmt mit Elektrophoresegerät 2Absolute γ -Globulinwerte:

Die absoluten Werte in Abbildung 14 und 15 steigen bis zur Altersgruppe 5 stark an. Danach ist die Zunahme weniger ausgeprägt. Ab Altersgruppe 7 stagnieren die Werte bei Elektrophoresegerät 2. Bei Elektrophoresegerät 1 steigen sie bis Altersgruppe 8 an und fallen dann wieder leicht ab. Für Elektrophoresegerät 1 ergeben sich im Kruskal-Wallis-Test hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$) zwischen den Altersgruppen 1 bis 6 und schwach signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Altersgruppen 5 bis 9. Die Unterschiede zwischen den Altersgruppen 6 bis 9 sind nicht signifikant ($p > 0,05$). Altersgruppe 1 und Altersgruppe 6 unterscheiden sich im U-Test ebenfalls hoch signifikant ($p <$

0,0001). Für Elektrophoresegerät 2 erhält man folgende Ergebnisse. Im Kruskal-Wallis-Test sind die Altersgruppen 1 bis 5 und die Altersgruppen 4 bis 9 hoch signifikant ($p < 0,0001$) unterschiedlich, die Altersgruppen 5 bis 9 sind nicht signifikant ($p > 0,05$) unterschiedlich; im U-Test sind die Altersgruppen 1 und 5 hoch signifikant ($p < 0,0001$) unterschiedlich.

Relative γ -Globulinwerte:

Die relativen Werte von Elektrophoresegerät 1 zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die absoluten Werte. Die relativen Werte von Elektrophoresegerät 2 haben im Vergleich zu den absoluten Werten ab Altersgruppe 7 eine leichte Tendenz zum Abfallen. Die statistischen Tests ergeben bei beiden Geräten für die relativen und absoluten Werte identische Resultate.

Bei Elektrophoresegerät 1 steigen die absoluten und relativen Werte zwischen den Altersgruppen 1 und 6 signifikant an und zeigen danach keine signifikanten Veränderungen mehr. Bei Elektrophoresegerät 2 ist ein signifikanter Anstieg der absoluten und relativen Werte bis Altersgruppe 5 nachweisbar.

4.1.2.7 Albumin-Globulin-Quotient (A/G)

Tabelle 19: Mittelwerte der Albumin-Globulin-Quotienten

Alters- gruppe	Alter	Mittelwert Elektrophorese- gerät 1	Mittelwert Elektrophorese- gerät 2
1	0 bis 6 Wochen	2,4	2,1
2	>6 Wochen bis 4 Monate	2,2	1,6
3	>4 bis 6 Monate	2,1	1,5
4	>6 bis 12 Monate	2,2	1,6
5	>1 bis 2 Jahre	2,1	1,5
6	>2 bis 5 Jahre	2,0	1,5
7	>5 bis 8 Jahre	1,7	1,4
8	>8 bis 10 Jahre	1,7	1,4
9	>10 Jahre	1,6	1,3

Tabelle 20: Standardabweichungen der Albumin-Globulin-Quotienten

Alters- gruppe	Alter	Standard- abweichung Elektrophorese- gerät 1	Standard- abweichung Elektrophorese- gerät 2
1	0 bis 6 Wochen	0,19	0,27
2	>6 Wochen bis 4 Monate	0,38	0,20
3	>4 bis 6 Monate	0,26	0,25
4	>6 bis 12 Monate	0,64	0,26
5	>1 bis 2 Jahre	0,46	0,25
6	>2 bis 5 Jahre	0,39	0,25
7	>5 bis 8 Jahre	0,30	0,23
8	>8 bis 10 Jahre	0,30	0,21
9	>10 Jahre	0,30	0,18

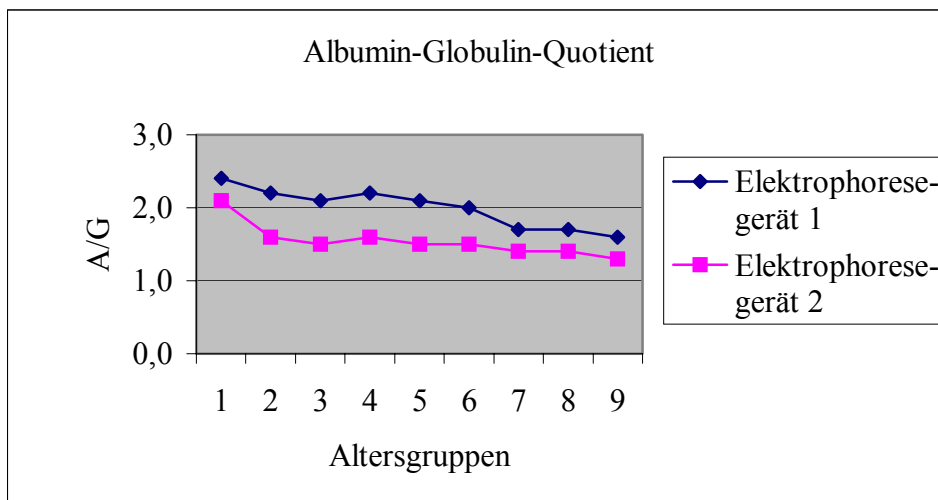


Abbildung 16: Verlauf der Mittelwerte der Albumin-Globulin-Quotienten

Die Kurvenzüge der Mittelwerte beider Geräte zeigen einen lebenslangen Abfall mit einem kurzen Anstieg bei Altersgruppe 4. Zwischen Altersgruppe 3 und 6 sinken die Werte nur schwach ab. Der Kruskal-Wallis-Test findet für die Altersgruppen 1 bis 6 bei Elektrophoresegerät 1 schwach signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) und für die Altersgruppen 6 bis 9 hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$). Der korrigierte U-Test ergibt für die Altersgruppen 1 und 3 ein schwach signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$), für die Altersgruppen 3 und 6 kein signifikantes Ergebnis ($p > 0,05$) und für die Altersgruppen 6 und 9 ein hoch signifikantes Ergebnis ($p < 0,0001$). Bei Elektrophoresegerät 2 ist mit dem

Kruskal-Wallis-Test $p < 0,0001$ für Altersgruppe 1 bis 6 und $p < 0,01$ für Altersgruppe 6 bis 9. Im korrigierten U-Test sind die Resultate wie folgt:

$p < 0,0001$ für Altersgruppe 1 und 3, $p > 0,05$ für Altersgruppe 3 und 6 und $p < 0,01$ für Altersgruppe 6 und 9.

Die Werte fallen bei beiden Geräten zwischen den Altersgruppen 1 und 3 signifikant ab, zeigen dann bis Altersgruppe 6 keine signifikanten Unterschiede und fallen dann zwischen Altersgruppe 6 und 9 nochmals signifikant ab.

4.1.2.8 Elektropherogramme

In den Abbildungen 17 bis 22 sind sechs Elektropherogramme als Beispiele abgebildet. Die Abbildungen 17 bis 19 sind mit Elektrophoresegerät 2 erstellt. Die Abbildungen 20 bis 22 sind die Elektropherogramme der selben Hunde wie in Abbildung 17 bis 19 nur mit Elektrophoresegerät 1 bestimmt. In den Kurvenzügen spiegeln sich die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Veränderungen der Fraktionen mit zunehmendem Alter wieder. In Abb. 17 ist eine α_0 -Fraktion angedeutet, die der Albuminfraktion zugerechnet wird.

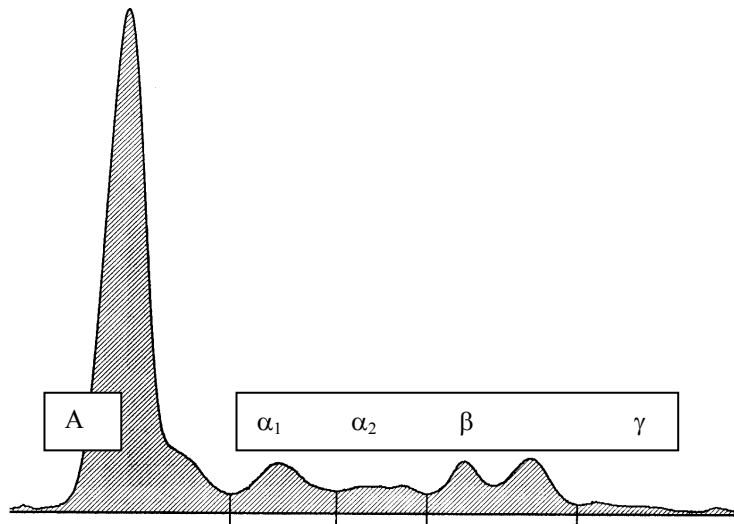


Abbildung 17: Hund, 6 Wochen alt (Elektrophoresegerät 2)

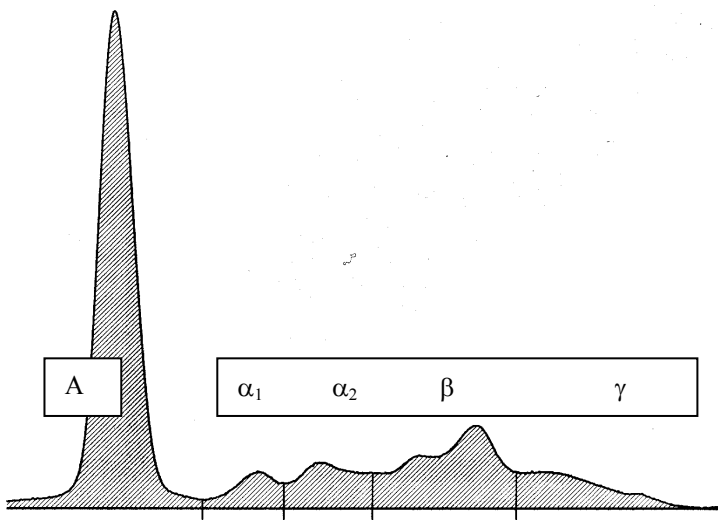


Abbildung 18: Hund, zwei Jahre alt (Elektrophoresegerät 2)

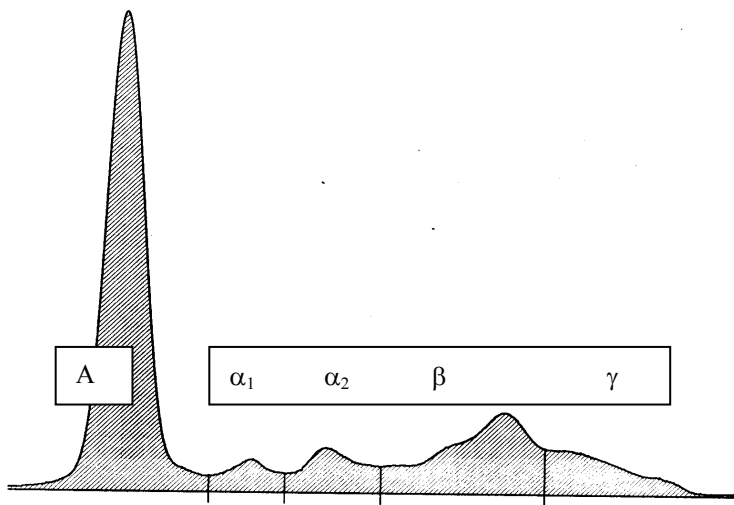


Abbildung 19: Hund, 10 Jahre alt (Elektrophoresegerät 2)

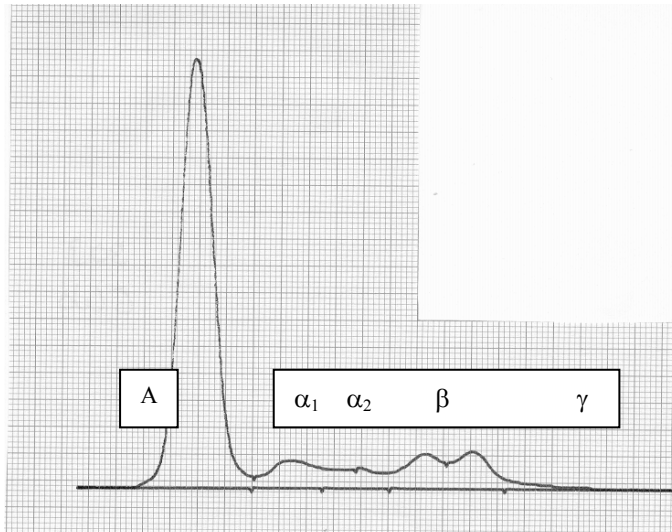


Abbildung 20: Hund, 6 Wochen alt (Elektrophoresegerät 1)

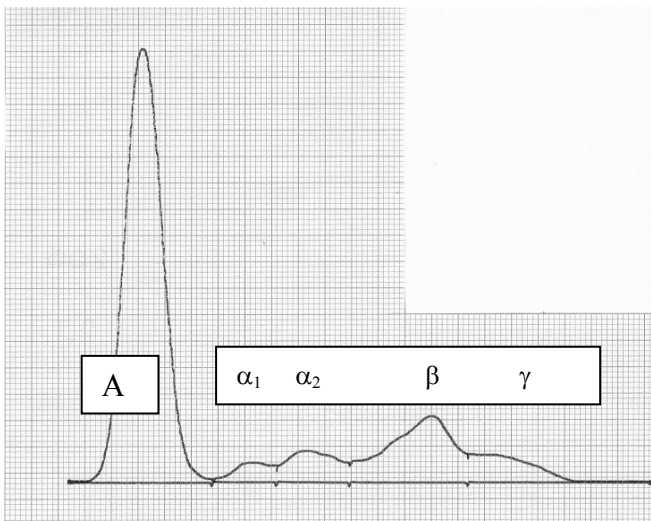


Abbildung 21: Hund, 2 Jahre alt (Elektrophoresegerät 1)

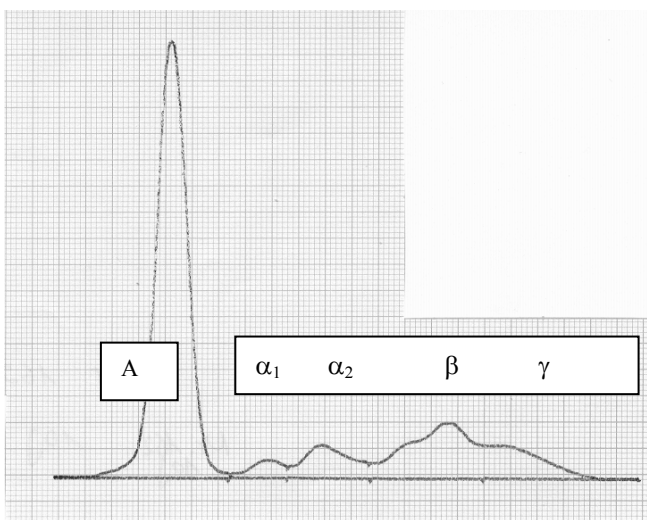


Abbildung 22: Hund, 10 Jahre alt (Elektrophoresegerät 1)

4.2 Vergleich der Gewichtsklassen innerhalb von Altersgruppen

Für die Parameter Gesamtprotein (g/l), α_1 -Globuline (g/l) und β -Globuline (g/l) können anhand des Kruskal-Wallis-Tests in keiner Altersgruppe signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen den Gewichtsklassen gefunden werden, unabhängig von der verwendeten Labormethode.

Die Parameter Albumin (g/l), α_2 -Globuline (g/l) und γ -Globuline (g/l) zeigen mit diesem Test in einzelnen Altersgruppen signifikante Unterschiede zwischen den Gewichtsklassen. Aus Tabelle 21 gehen diese Altersgruppen und die Signifikanzniveaus, mit denen sich die Gewichtsklassen in diesen Altersgruppen unterscheiden, hervor.

Gewichtsklasse 4 wurde in Altersgruppe D nicht in die Untersuchungen mit einbezogen, da die Anzahl der Stichproben dieser Gruppe zu klein ist.

Legende zu Tabelle 21:

Altersgruppe A: 0 bis 2 Jahre

Altersgruppe B: >2 bis 6 Jahre

Altersgruppe C: >6 bis <10 Jahre

Altersgruppe D: 10 Jahre und älter

Gewichtsklasse 1 (0 bis 10 kg KGW)

Gewichtsklasse 2 (>10 kg bis 25 kg KGW)

Gewichtsklasse 3 (>25 kg bis 40 kg KGW)

Gewichtsklasse 4 (>40 kg KGW)

Tabelle 21:

Altersgruppe	Parameter (g/l)	Analysengerät	Signifikanzniveau (p)
A	Albumin	Hitachi Analyser	$0,01 < p < 0,05$
A	Albumin	Elektrophoresegerät 1	$0,01 < p < 0,05$
B	Albumin	Hitachi Analyser	$0,001 < p < 0,01$
B	Albumin	Elektrophoresegerät 1	$0,01 < p < 0,05$
B	Albumin	Elektrophoresegerät 2	$0,01 < p < 0,05$
B	γ -Globuline	Elektrophoresegerät 1	$p < 0,001$
B	γ -Globuline	Elektrophoresegerät 2	$0,01 < p < 0,05$
C	Albumin	Hitachi Analyser	$p < 0,001$
C	Albumin	Elektrophoresegerät 1	$0,01 < p < 0,05$
C	Albumin	Elektrophoresegerät 2	$0,01 < p < 0,05$
D	α_2 -Globuline	Elektrophoresegerät 1	$0,001 < p < 0,01$
D	α_2 -Globuline	Elektrophoresegerät 2	$0,001 < p < 0,01$

4.3 Vergleich der Analysengeräte

Um die Messgeräte zu vergleichen, wurden Gerätepaare gebildet und ihre Korrelation, bezogen auf die einzelnen Parameter, untersucht. Die Korrelationskoeffizienten r_s nach Spearman sind in Tabelle 22 abgebildet.

Tabelle 22: Korrelation der Gerätepaare

Geräte	Parameter	Korrelationskoeffizient r_s	Signifikanz einseitig	Anzahl der Proben
Hitachi - Gerät 1	Albumin g/l	0,731	0,01	397
Hitachi - Gerät 2	Albumin g/l	0,778	0,01	337
Gerät 1 - Gerät 2	Albumin g/l	0,888	0,01	328
Gerät 1 - Gerät 2	α_1 -Globuline g/l	0,650	0,01	328
Gerät 1 - Gerät 2	α_2 -Globuline g/l	0,629	0,01	328
Gerät 1 - Gerät 2	β -Globuline g/l	0,864	0,01	328
Gerät 1 - Gerät 2	γ -Globuline g/l	0,863	0,01	328

Elektrophoresegerät 2 ist bezüglich des Albumins mit dem Hitachi-Analyser strenger korreliert als Elektrophoresegerät 1. Der Korrelationskoeffizient dieses Paares ist mit 0,778 etwas höher als der Korrelationskoeffizient von Elektrophoresegerät 1 und dem Hitachi-Analyser, der 0,731 beträgt.

Die graphischen Darstellungen der Korrelationen sind aus den nachfolgenden Abbildungen 23 bis 29 ersichtlich.

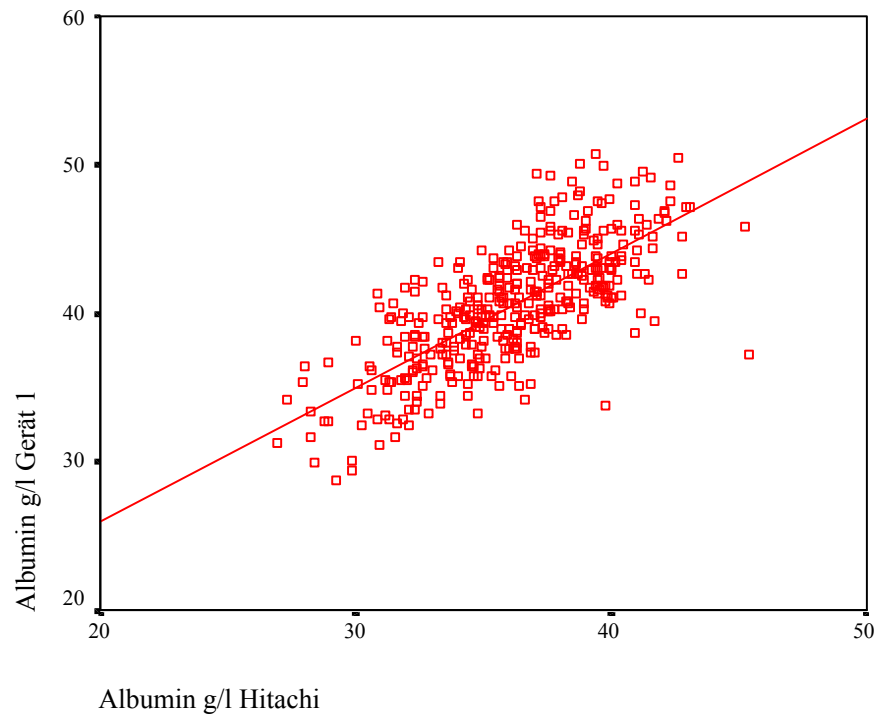


Abbildung 23: Albumin Hitachi / Albumin Gerät 1

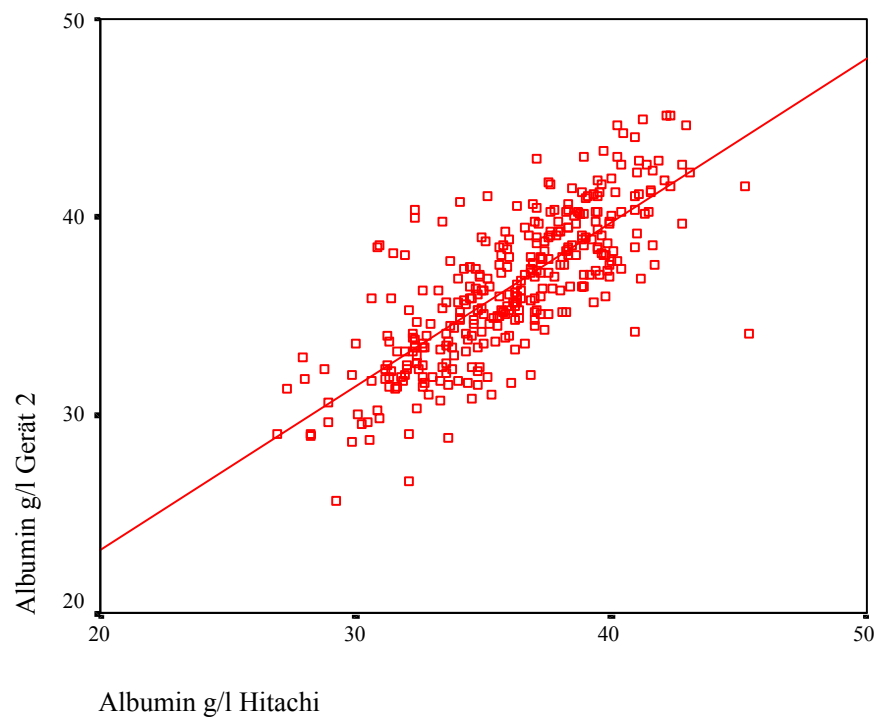


Abbildung 24: Albumin Hitachi / Albumin Gerät 2

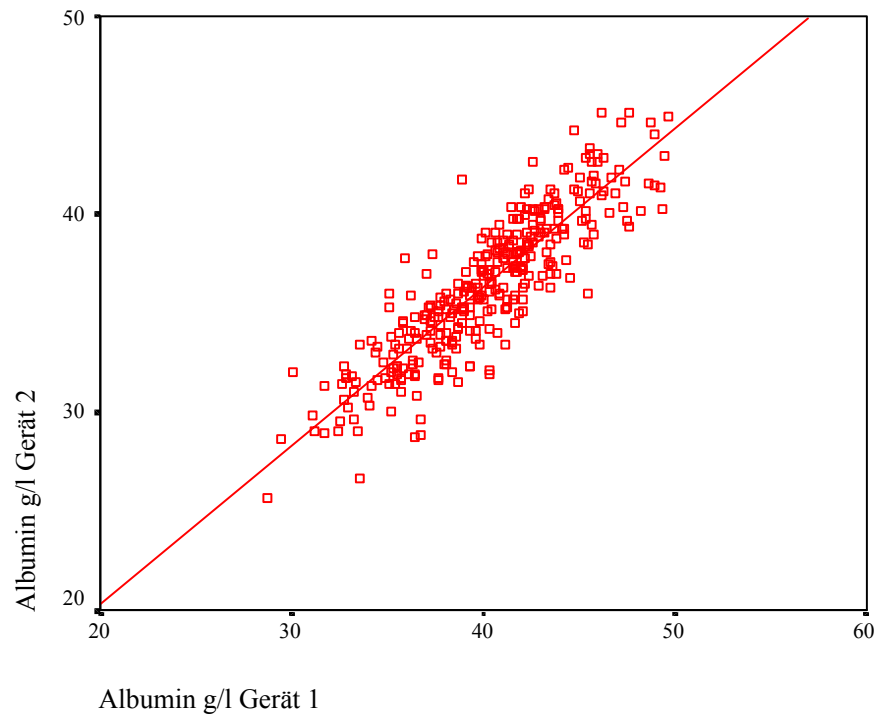


Abbildung 25: Albumin Gerät 1 / Albumin Gerät 2

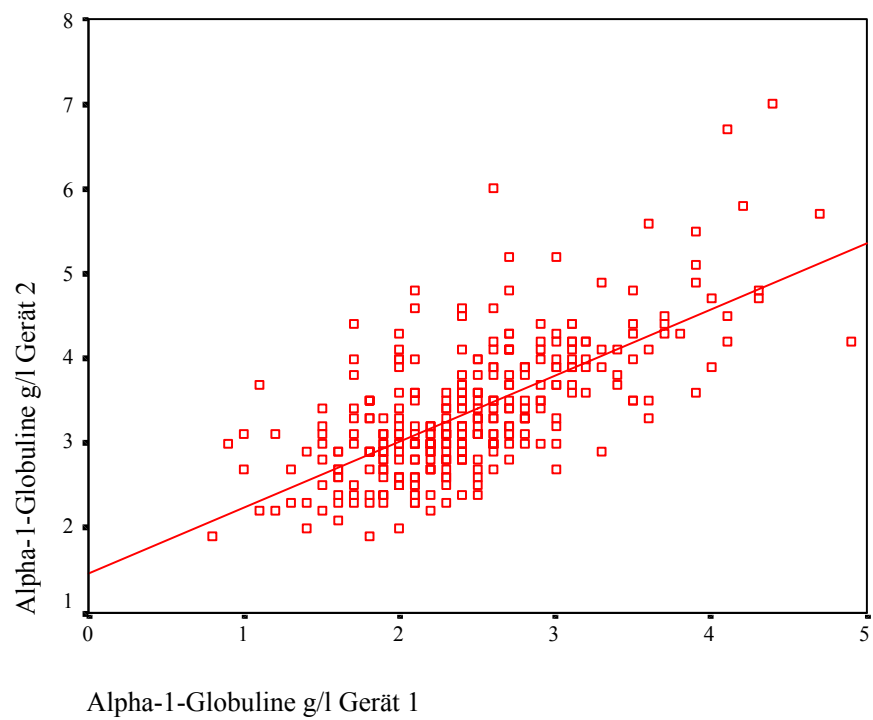


Abbildung 26: α_1 -Globuline Gerät 1 / α_1 -Globuline Gerät 2

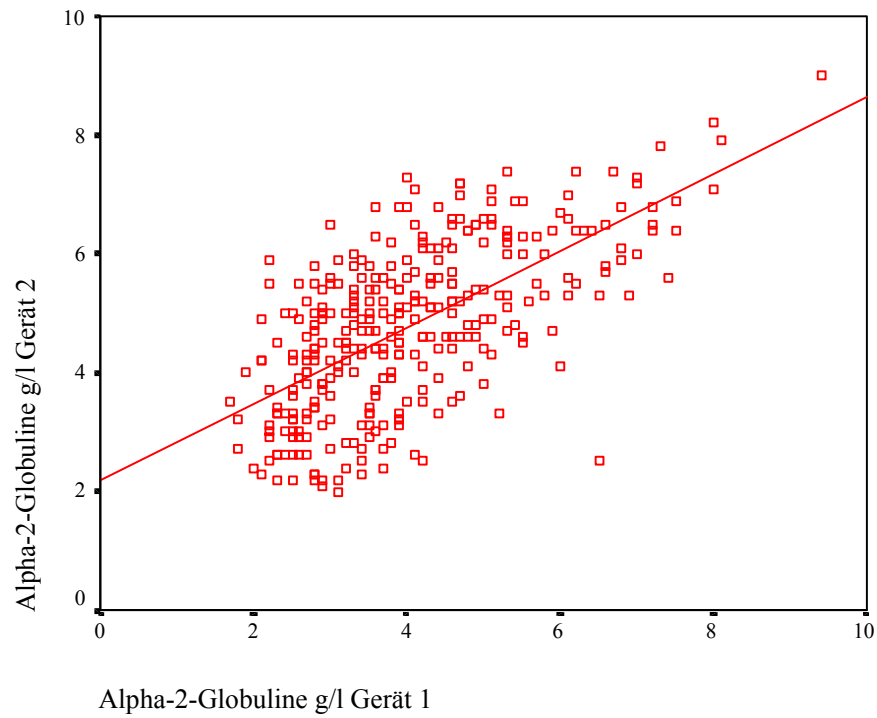


Abbildung 27: α_2 -Globuline Gerät 1 / α_2 -Globuline Gerät 2

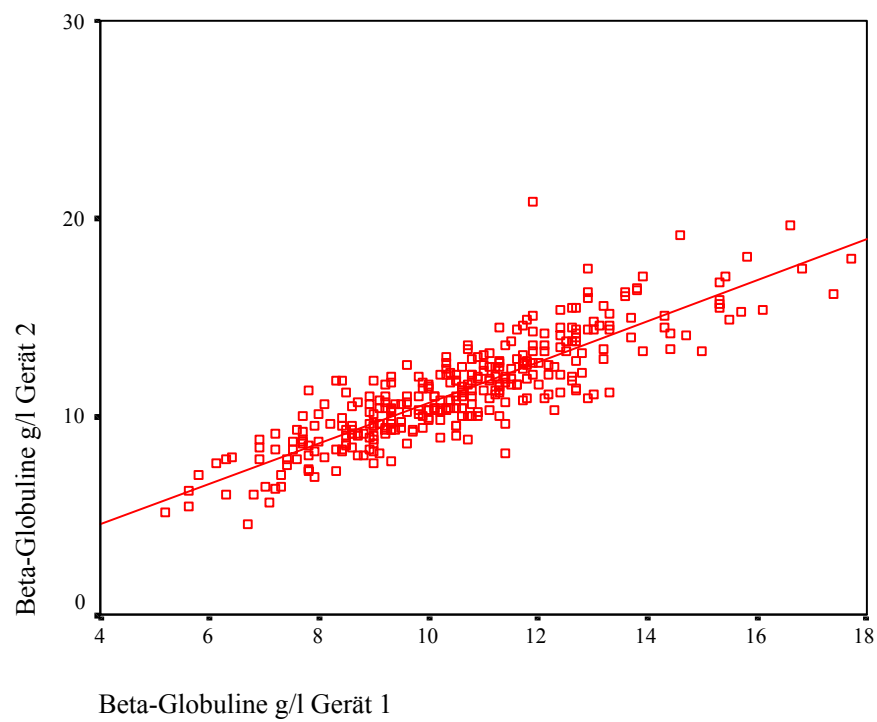


Abbildung 28: β -Globuline Gerät 1 / β -Globuline Gerät 2

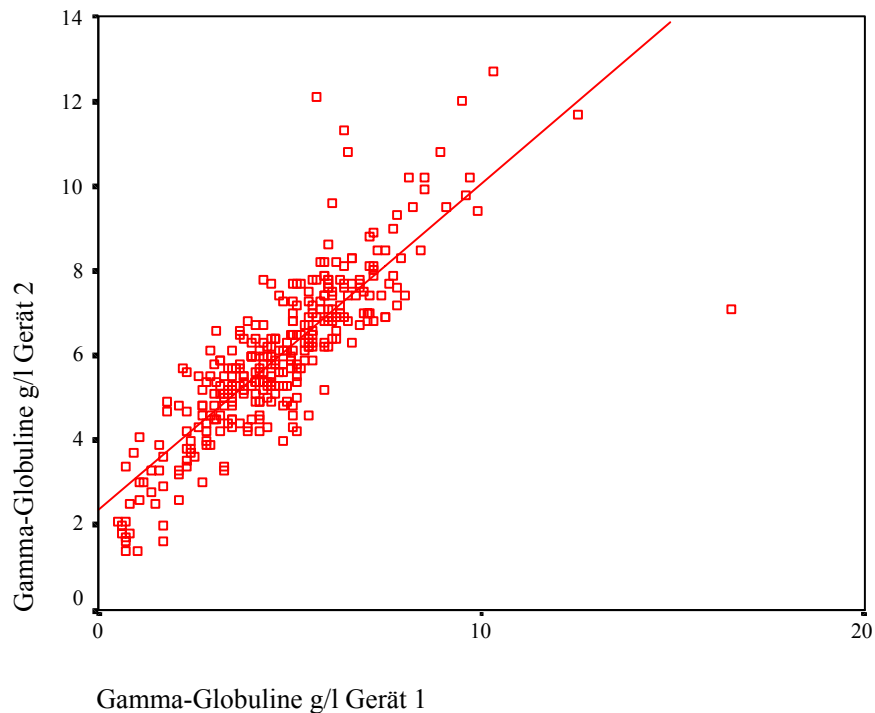


Abbildung 29: γ -Globuline Gerät 1 / γ -Globuline Gerät 2

Aus Tabelle 23 und den Abbildungen 23 bis 29 ergibt sich außerdem, dass zwischen den Elektrophoresegeräten für die Parameter Albumin, β -Globuline und γ -Globuline eine ausreichend gute Übereinstimmung vorliegt. Weniger gut stimmen die Ergebnisse dieser Geräte für die Parameter α_1 - und α_2 -Globuline überein.

In Tabelle 24 sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen, Minima und Maxima der Parameter für jedes Analysengerät abgebildet. Diese Werte wurden aus den Messergebnissen der 328 Serumproben errechnet, die mit allen drei Geräten analysiert wurden. Dadurch sind die Werte gut vergleichbar. Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima des Parameters Albumin unterscheiden sich bei der Bestimmung mit dem Hitachi-Analyser und dem Elektrophoresegerät 2 nur wenig. Die Werte, die aus den Messergebnissen von Elektrophoresegerät 1 ermittelt wurden, sind dagegen deutlich höher.

Für die anderen Fraktionen liefert Elektrophoresegerät 1 niedrigere Werte als Elektrophoresegerät 2.

Tabelle 24:

Parameter	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum
Albumin g/l (Hitachi)	36,0	3,44	27,0	45,4
Albumin g/l (Gerät 1)	40,1	4,05	28,7	49,6
Albumin g/l (Gerät 2)	36,4	3,68	25,7	45,1
Albumin % (Gerät 1)	65,2	4,93	44,9	80,3
Albumin % (Gerät 2)	59,0	4,49	39,1	72,6
α_1 -Globuline g/l (Gerät1)	2,4	0,67	0,8	4,9
α_1 -Globuline g/l (Gerät2)	3,4	0,77	1,9	7,0
α_1 -Globuline % (Gerät1)	4,0	1,30	1,3	9,1
α_1 -Globuline % (Gerät2)	5,5	1,53	3,1	12,9
α_2 -Globuline g/l (Gerät1)	4,0	1,37	1,7	9,4
α_2 -Globuline g/l (Gerät2)	4,8	1,38	2,0	9,0
α_2 -Globuline % (Gerät1)	6,4	1,93	2,8	12,9
α_2 -Globuline % (Gerät2)	7,7	1,96	3,2	12,9
β -Globuline g/l (Gerät1)	10,6	2,20	5,2	17,7
β -Globuline g/l (Gerät2)	11,3	2,62	4,6	20,9
β -Globuline % (Gerät1)	17,0	2,54	11,0	24,9
β -Globuline % (Gerät2)	18,1	3,08	10,5	27,7
γ -Globuline g/l (Gerät1)	4,7	2,04	0,5	16,5
γ -Globuline g/l (Gerät2)	6,0	1,87	1,4	12,7
γ -Globuline % (Gerät1)	7,3	2,70	1,0	17,1
γ -Globuline % (Gerät2)	9,5	2,44	3,0	17,9

5 Diskussion

5.1 Die Altersabhängigkeit des Gesamtproteins und der Proteinfraktionen

5.1.1 Gesamtprotein

Das Gesamtprotein zeigt einen lebenslangen, signifikanten Anstieg. Beim Welpen und Junghund ist dieser stärker ausgeprägt als bei den über zwei Jahre alten, erwachsenen Tieren.

Die Ergebnisse stehen in Einklang mit den Resultaten von Kraft et al. (1996) und Schalm (1970). Andere Autoren ermitteln ebenfalls eine positive Korrelation des Gesamtproteins mit dem Alter. Allerdings differiert der Verlauf der Werte vom Ergebnis dieser Untersuchung. Zum einen wird bei alten Tieren über ein leichtes Absinken der Werte (Tomoda, 1963; Pickrell et al., 1974), zum anderen über einen stufenweisen Anstieg (Fukuda et al., 1989) oder über ein Stagnieren der Werte ab einem bestimmten Alter (Michelson et al., 1966; Bulgin et al., 1971) berichtet.

Kuhl et al. (2000) geben für 50 - 58 Tage alte Welpen einen Mittelwert von 47,5 g/l (4,75 g/dl) Gesamtprotein an. Die hier ermittelten Werte von 45,5 g/l für bis zu 42 Tage (6 Wochen) alte Welpen und 51,7 g/l für die 43 bis 112 Tage (>6 Wochen bis 4 Monate) alten Tiere stimmen damit gut überein.

Wie aus dem Ergebnisteil ersichtlich, besteht für jede der einzelnen Fraktionen eine signifikante Altersabhängigkeit. Bis auf die negativ korrelierten α_1 -Globuline nehmen alle Fraktionen mit zunehmendem Alter zu. Diese Effekte addieren sich. Die Zunahme des Gesamtproteins mit dem Alter ergibt sich also aus dem Verhalten der Fraktionen. Die Gründe, weshalb sich die Fraktionen verändern, werden für jede Fraktion einzeln besprochen.

Kraft et al. (1996) geben zu Bedenken, dass beim Welpen eine höhere Menge an Gesamtkörperwasser vorliegt und dies zu einer niedrigeren Proteinkonzentration beitragen kann. Dieser Zusammenhang wirkt sich natürlich nicht nur auf das Gesamtprotein aus, sondern auch auf die einzelnen Fraktionen.

5.1.2 Albumin

Die absoluten Albuminwerte steigen beim Jungtier an, bis sie bei ein- bis zweijährigen Tieren etwa die Werte erwachsener Tiere erreicht haben, und bleiben dann annähernd gleich. Statistisch lässt sich diese Altersgrenze für das mit dem Hitachi-Analyser bestimmte Albumin nachweisen. Für Elektrophoresegerät 2 ist dieser Anstieg nur bis zum Alter von einem Jahr signifikant, stellt sich aber tendenziell bis zum Alter von ein bis zwei Jahren weiter dar. Für Elektrophoresegerät 1 liegt die nachweisbare Altersgrenze etwas höher, nämlich bei den zwei- bis fünfjährigen Tieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Methode der Bromcresolgrün-Komplexbildung, mit der der Hitachi-Analyser arbeitet, zuverlässige und genaue Ergebnisse bei der Albuminbestimmung liefert (Slater et al., 1975; Gustafsson et al., 1976). Im Vergleich dazu wird mehrfach die Ungenauigkeit der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese im Zusammenhang mit der Albuminbestimmung erwähnt (Schütz, 1971; Slater et al., 1975; Blauärmel, 1978; Sauer u. Hirschberger, 1992). Deshalb wird den Resultaten des Hitachi-Analysers das größere Vertrauen geschenkt.

Die relativen Mittelwerte zeigen einen lebenslangen Abfall. Für Elektrophoresegerät 2 lässt sich dieser Verlauf auch statistisch belegen. Für Elektrophoresegerät 1 ist dies erst ab dem Alter von zwei Jahren der Fall, da zuvor keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen gefunden wurden. In diesem Lebensabschnitt liegt nur ein tendenzielles Absinken vor.

Das Verhalten des Albumins in Abhängigkeit vom Alter wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zumindest teilweise Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Studie findet man bei Bulgin et al. (1971) und Tomoda (1963) für die absoluten Werte und bei Batamuzi et al. (1996) und McKelvie et al. (1966) für die relativen Werte. Für alte Tiere ergibt sich bei Tomoda (1963) allerdings ein tendenzielles Absinken der Albuminwerte, wie es auch schon für das Gesamtprotein von ihm beschrieben wurde. In der Studie von Bulgin et al. (1971) werden die Erwachsenenwerte schon mit acht Monaten erreicht. Andere Autoren sprechen vom Abfallen der absoluten Werte (Kaspar u. Norris, 1977; Mosier, 1989; Lowseth et al., 1990; Strasser et al., 1993) oder von keiner Veränderung der Albuminwerte mit zunehmendem Alter (Barsanti et al., 1977; Pickrell et al.,

1974). Gute Übereinstimmung besteht mit den Ergebnissen von Kuhl et al. (2000) für die Welpen.

Zur Erklärung der Ergebnisse muss beachtet werden, dass kurz nach der Geburt eine noch unzureichende Synthesefähigkeit der Leber vorliegt (Wolford et al., 1988). Da das Albumin in der Leber gebildet wird, kann es erst mit ansteigender Syntheseleistung dieses Organs zunehmen. Der höhere Anteil des Gesamtkörperwassers beim Junghund wird auch hier einen Einfluss auf die Werte haben.

Das Absinken der relativen Werte erscheint auf den ersten Blick unvereinbar mit dem Anstieg der absoluten Albuminwerte. Bei Jungtieren ist der prozentuale Anteil des Albumins aber höher, da bis auf die α_1 -Globuline alle anderen Fraktionen mit zunehmendem Alter ansteigen und aus diesem Grund bei Jungtieren noch niedrig sind. Der Anstieg dieser Fraktionen geht hauptsächlich auf Kosten des Albuminanteils, der mit zunehmendem Alter absinkt.

5.1.3 α_1 -Globuline

Die absoluten Werte dieser Fraktion sinken statistisch nachweisbar bis zum ersten Lebensjahr ab und bleiben dann nahezu gleich. Die absoluten und relativen Werte verhalten sich ähnlich. Die relativen Werte nehmen vom Welpen bis zum Alter von ein bis zwei Jahren signifikant ab und bleiben dann bei den erwachsenen Tieren ebenfalls konstant. Diese Resultate ergeben sich bei beiden Geräten.

Über ein Absinken dieser Fraktion berichten nur McKelvie et al. (1966), Groulade et al. (1970) und Bulgin et al. (1971). Letztere unterscheiden allerdings nicht zwischen α_1 - und α_2 -Globulinen, sondern sprechen nur vom Absinken der α -Fraktion.

Es gibt wenige Angaben über altersbedingte Veränderungen für die einzelnen Proteine dieser Fraktion. Die vorliegenden Informationen über das Fetoprotein und das α_1 -Antitrypsin können das Verhalten der α_1 -Globuline nicht erklären. Das Fetoprotein sinkt in den ersten beiden Lebenswochen stark ab und hat damit nach diesem Zeitpunkt schon fast die Werte beim erwachsenen Hund erreicht (Yamada et al., 1995). Die Veränderung des Fetoproteinspiegels hat daher wohl kaum große Auswirkungen auf den Verlauf der α_1 -Globuline. Hughes et al. (1995) stellen für

das α_1 -Antitrypsin keine Altersabhängigkeit fest. Allerdings waren in diese Studie nur Hunde ab einem Jahr einbezogen. Aussagen über die entscheidende Phase von der Geburt bis zum Alter von einem Jahr liegen aber nicht vor.

5.1.4 α_2 -Globuline

Fasst man die Ergebnisse der beiden Geräte zusammen, ist ein lebenslanger, aber stufenweise erfolgreicher Anstieg dieser Proteingruppe statistisch nachzuweisen. Nach einer deutlichen Zunahme während des Wachstums stagnieren die Werte beim Erreichen des Erwachsenenalters. Im Seniorenalter steigt die Fraktion nochmals kontinuierlich an.

Die relativen Werte steigen lebenslang nachweisbar an, wobei die Resultate von Elektrophoresegerät 1 bis zum Alter von zwei bis fünf Jahren als tendenzielle Zunahme zu bezeichnen sind.

Zum gleichen Resultat gelangen McKelvie et al. (1966) für die relativen Werte während des ersten Lebensjahrs bei Beaglen. Über den weiteren Verlauf machen sie keine Aussage. Strasser et al. (1993) zeigen eine positiv korrelierte Altersabhängigkeit für die absoluten Werte auf. Die Ergebnisse der eigenen Studie stimmen mit den Untersuchungen von Barsanti et al. (1977) und Tomoda (1963) nicht überein, die über keine Altersabhängigkeit der α_2 -Globuline und über ein Absinken nach der Geburt berichten.

Die α_2 -Globuline werden in der Leber synthetisiert. Die wichtigsten Proteine dieser Gruppe sind Transportproteine und Akute-Phase-Proteine (vgl. Tabelle 1). Die ansteigende Syntheseleistung der Leber bewirkt ähnlich wie beim Albumin eine Zunahme dieser Proteingruppe. Der nochmalige Anstieg im Alter lässt sich durch diese physiologischen Gegebenheiten nicht erklären. Im Gegenteil, die Leberfunktion ist bei alten Tieren im Vergleich zu jüngeren erwachsenen Tieren reduziert (Goldston, 1995).

Über die Altersabhängigkeit einzelner Proteine dieser Gruppe ist noch wenig bekannt. Das α_2 -Makroglobulin unterliegt nach Ganrot (1968) einer Altersabhängigkeit. Er stellt im Alter von einem Jahr die maximale Konzentration dieses Proteins fest. Die ältesten Tiere waren vier Jahre alt. Allerdings schränkt er die Aussagekraft seiner Untersuchung wegen der geringen Tierzahl in den

Altersgruppen selbst ein. Ob dies den tatsächlichen Verhältnissen entspricht, ist deshalb fraglich.

Bei alten Menschen wurden höhere Serumkonzentrationen des α_2 -Makroglobulins und verschiedener Zytokine als bei jungen Erwachsenen festgestellt. Zu den im Alter in höheren Konzentrationen vorliegenden Zytokinen zählen beim Menschen auch das Interleukin-1, das Interleukin-6 und der Tumor-Nekrose-Faktor- α (Rink u. Seyfarth, 1997). Strasser et al. (2000) konnten für Interleukin-1 und den Tumor-Nekrose-Faktor beim Hund keine Altersabhängigkeit feststellen. Die Zytokine Interleukin-1, Interleukin-6 und der Tumor-Nekrose-Faktor aktivieren beim Hund (Yamashita et al., 1994) und beim Menschen (Thompson et al., 1992) die Leber zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen. Inwieweit die erhöhten Konzentrationen dieser Zytokine im Seniorenalter, die beim Menschen nachgewiesen sind, die Produktion der Akute-Phase-Proteine in diesem Lebensabschnitt beeinflussen, ist unbekannt.

5.1.5 β -Globuline

Diese Fraktion zeigt einen lebenslangen Anstieg. Allerdings ist im Alter von vier Monaten bis zu einem Jahr keine Zunahme sichtbar. Dieser Verlauf lässt sich für die absoluten und relativen Werte für beide Elektrophoresegeräte statistisch nachweisen.

Die Zunahme der β -Globuline mit steigendem Alter, die sich auch in den Untersuchungen von McKelvie et al. (1966), Bulgin et al. (1971), Barsanti et al. (1977) und Batamuzi et al. (1996) ergab, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden, wenn auch im Detail teilweise Unterschiede bestehen. Bulgin et al. (1971) können, wie schon für die zuvor genannten Fraktionen, nur bis zum Alter von acht Monaten Veränderungen feststellen. Für über acht Monate alte Tiere stimmen die Ergebnisse von Bulgin et al. (1971) mit den Resultaten der eigenen Studie nicht überein. Konträre Feststellungen gibt es von Strasser et al. (1993) und Tomoda (1963). Strasser et al. (1993) verneinen das Vorhandensein einer altersbedingten Veränderung dieser Fraktion. Tomoda (1963) berichtet über einen Abfall der Werte mit zunehmendem Alter.

IgM wandert beim Hund in der β_2 -Fraktion (Schultz, 1984). Es wird zum einen von einem klaren Anstieg mit zunehmendem Alter dieser Proteingruppe (Glickman et al., 1988), zum anderen von einem tendenziellen Anstieg gesprochen (Schreiber et al., 1992). IgM verhält sich also gleichsinnig mit dem in dieser Studie gefundenen Verlauf der β -Globuline. Alle anderen Proteine dieser Fraktion werden in der Leber gebildet. Sie unterliegen also der sich mit dem Alter verändernden Syntheseleistung dieses Organs. Über die Altersabhängigkeit dieser Proteine ist noch wenig bekannt. Die Komplementkomponenten gehören zu dieser Gruppe. Von Strasser et al. (2000) gibt es Aussagen über ihre Altersabhängigkeit. Die Autoren stellten eine höhere Aktivität des Komplementsystems bei alten Hunden als bei jungen Hunden fest.

5.1.6 γ -Globuline

Bis zum Erreichen des Erwachsenenalters ist ein starker Anstieg dieser Fraktion zu verzeichnen. Die anschließende Zunahme der γ -Globuline kann nur als ein Trend bezeichnet werden, da diese statistisch nicht nachweisbar ist. Kleine Unterschiede bestehen bezüglich des signifikanten Anstiegs zwischen den beiden Elektrophoresegeräte. Für Elektrophoresegerät 1 ist er bis zu Altersgruppe 6 nachzuweisen, für Elektrophoresegerät 2 bis Altersgruppe 5.

Die von Tomoda (1963), McKelvie (1966), Michelson et al. (1966), Barsanti et al. (1977), Strasser et al. (1993) und Batamuzi et al. (1996) festgestellte Altersabhängigkeit dieser Fraktion kann anhand dieser Studie bestätigt werden. Bulgin et al. (1971) beschreibt nach dem Erreichen des achten Lebensmonats keinen weiteren Anstieg mehr. Dieser Zeitpunkt unterscheidet sich von den vorliegenden Resultaten.

Ab dem zweiten Lebensmonat sind Hundewelpen zur eigenen Antikörpersynthese fähig (Rüsse, 1971). Deshalb kommt es ab diesem Zeitpunkt zum Anstieg der γ -Globuline, die sich hauptsächlich aus Immunglobulinen zusammensetzen. Im Laufe des Lebens kommt der Hund mit verschiedenen Antigenen in Kontakt, die das Immunsystem stimulieren und zu einer spezifischen Immunantwort führen (Batamuzi et al., 1996). Dadurch lässt sich die Zunahme mit fortschreitendem Alter erklären. Das Immunsystem unterliegt allerdings auch einem deutlichen

Alterungsprozess. Die Immunantwort erreicht ihre maximale Kapazität nach der Pubertät und fällt dann im Alter deutlich ab (Schultz, 1984). Deshalb kommt es trotz einer fortgesetzten Stimulation durch Antigene zu keinem weiteren signifikanten Anstieg im Erwachsenenalter.

Ebenso wie für IgM gibt es für IgG (Glickman et al., 1988) und IgA (Glickman et al., 1988; Schreiber et al., 1992) klare Aussagen über altersbedingte Zunahmen beim Hund.

5.1.7 Albumin-Globulin-Quotient

Dieser Quotient sinkt prinzipiell lebenslang ab. Allerdings sind vom sechsten Lebensmonat bis zum fünften Lebensjahr keine statistisch relevanten Veränderungen nachweisbar.

Der Verlauf ergibt sich aus dem Verhalten des Albumins und der Globulinfraktionen. Da die relativen Albuminwerte mit zunehmendem Alter abnehmen und bis auf die α_1 -Globuline alle anderen Globulinfraktionen zunehmen, nimmt der gebildete Quotient ebenfalls ab.

5.1.8 Abschließende Bemerkungen

Wie aus den vorhergehenden Abschnitten ersichtlich, verändert sich der Kurvenverlauf der Mittelwerte bei einigen der untersuchten Proteinfractionen und beim Gesamtprotein im Alter von ein bis zwei Jahren. Dieses Alter kann für den Hund, ohne Berücksichtigung von Besonderheiten einzelner Rassen, als Beginn des Erwachsenenalters betrachtet werden. Dieser Lebensabschnitt spielt für den altersabhängigen Verlauf der Fraktionen also eine besondere Rolle. Teilweise lässt sich dieses Verhalten durch die oben genannten physiologischen Fakten erklären, teilweise sind die Zusammenhänge aber noch nicht geklärt.

Die beste Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Studie ergeben die Untersuchungen von Bulgin et al. (1971) und McKelvie et al. (1966). Letztere machen aber nur bis zum Alter von einem Jahr Aussagen. Bei Bulgin et al. (1971) zeigen die Fraktionen allerdings nur bis zum Alter von acht Monaten Veränderungen. Ihre Untersuchungen beschränkten sich außerdem auf Hunde der

Rasse Beagle. Allard et al (1988) geben für die Rasse Beagle das Lebensalter von 30 Wochen als Wachstumsende an. Das Alter von acht Monaten kann also als ungefähre Beginn des Erwachsenenalters dieser Rasse bezeichnet werden. Der Unterschied bezüglich dieses Alterszeitpunktes wird durch die Verwendung unterschiedlicher Hunderassen in der vorliegenden Studie bedingt. Es wurden absichtlich möglichst viele verschiedene Hunderassen in die Untersuchungen einbezogen, um repräsentative Ergebnisse für den Hund im Allgemeinen zu erhalten.

5.1.9 Elektropherogramme

Die abgebildeten Elektropherogramme sind typisch für ihre Altersgruppen. Die Veränderungen der Fraktionen mit zunehmendem Alter spiegeln sich in den Elektrophoresemustern wieder. Die Beurteilung des Kurvenverlaufs spielt in der klinischen Labordiagnostik eine wichtige Rolle (Groulade et al., 1970; Wicher u. Spence, 1987; Eckersall u. Conner, 1988), besonders bei der Identifikation von monoklonalen Gammopathien (Wicher u. Spence, 1987). Die Betrachtung des Kurvenzugs ist also ein wichtiger Schritt bei der Interpretation eines elektrophoretischen Ergebnisses. Die abgebildeten Elektropherogramme können als Orientierungshilfe bei der Beurteilung von Elektrophoresemustern in den verschiedenen Lebensabschnitten benutzt werden.

5.2 Vergleich von Gewichtsklassen innerhalb von Altersgruppen

Die bekannte Situation, dass verschiedene Hunderassen eine unterschiedliche Lebenserwartung, eine unterschiedliche Wachstumsdauer und einen differierenden Alterungsprozess haben, beeinflusst vermutlich Untersuchungen, die sich mit der Altersabhängigkeit von Parametern beim Hund beschäftigen. Die Einteilung in Gewichtsklassen dient der Zusammenfassung von kleinen, mittelgroßen und großen Rassen sowie Riesenrassen. Das Gewicht ist leichter zu ermitteln als die Körpergröße und steht normalerweise mit dieser in einem positiven Zusammenhang. Die Grenzen zwischen den Altersgruppen wurden so gezogen, dass Wachstum und Altern berücksichtigt wurden. Wie aus der Literatur hervorgeht, dauert bei Riesenrassen das Wachstum am längsten und ist mit ungefähr zwei Jahren abgeschlossen. Andere Hunderassen werden früher erwachsen. Altersgruppe A (0 bis 2 Jahre alte Tiere) ist also eine gemischte Gruppe, in der in den unterschiedlichen Gewichtsklassen die Anzahl an Jung- und Adulttieren variiert. Altersgruppe B (>2 bis 6 Jahre) wurde so gewählt, dass das Wachstum bei allen Hunden möglichst abgeschlossen ist, das Seniorenalter aber noch nicht begonnen hat. Somit wurde eine homogene Gruppe mit adulten Tieren gebildet. Nach Kraft (1998) werden Hunde zwischen dem siebten und dem zehnten Lebensjahr geriatrisch. Im Allgemeinen beginnt dieser Prozess bei großen Rassen früher als bei kleinen. Altersgruppe C (>6 Jahre bis <10 Jahre) setzt sich also zum Teil aus Senioren und erwachsenen Tieren zusammen. Altersgruppe D (10 Jahre und ältere Tiere) ist dagegen homogener und setzt sich überwiegend aus Senioren zusammen. Die Abweichung einzelner Individuen wird bei dieser Einteilung allerdings nicht berücksichtigt.

Aus dem Vergleich der Gewichtsklassen in den Altersgruppen sind keine Gesetzmäßigkeiten abzuleiten. Für die Parameter Gesamtprotein, α_1 -Globuline und β -Globuline sind nicht einmal schwach signifikante Unterschiede gefunden worden, die Ergebnisse der anderen drei Parameter sind unregelmäßig. Legt man die oben dargestellten Überlegungen zugrunde, wären zwischen den Gewichtsklassen in den Altersgruppen A und C Unterschiede zu erwarten. Es stellen sich aber lediglich für den Parameter Albumin in diesen Altersgruppen signifikante Unterschiede dar. Für Albumin und die γ -Globuline wurden in

Altersgruppe B Unterschiede ermittelt, obwohl in dieser Gruppe von einer Homogenität ausgegangen wurde. Dasselbe gilt für die Ergebnisse der α_2 -Globuline in Altersgruppe D.

Die Einteilung in Gewichtsklassen innerhalb von Altersgruppen kann das oben beschriebene Problem also nicht aussagekräftig darstellen.

Besteht besonderes Interesse für eine Rasse, ist es günstiger, für diese Rasse spezielle Untersuchungen durchzuführen um den Einfluss von Wachstum und Altern sowie anderen rassetypischen Besonderheiten auf die in dieser Studie untersuchten Parameter zu erfassen. Untersuchungen für einzelne Rassen können im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt werden, da auf Grund der großen Rassenvielfalt zu wenig Vertreter der einzelnen Rassen vorhanden sind.

5.3 Vergleich der Analysengeräte

Der Gerätevergleich ergibt eine bessere Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen Elektrophoresegerät 2 (Elphoscan Mini) und dem Hitachi-Analyser als zwischen dem Elektrophoresegerät 1 (Elpho-Mikro-Rapid-Kammer) und dem Hitachi-Analyser. Die Übereinstimmung der Messergebnisse für die einzelnen Proben beider Elektrophoresegeräte mit dem Hitachi-Analyser ist für das Albumin aber nur mäßig gut. Betrachtet man die Mittelwerte (Tab. 24), ist ihre Differenz zwischen dem Hitachi-Analyser und dem Gerät Elephoscan Mini wesentlich geringer als zwischen dem Hitachi-Analyser und der Elpho-Mikro-Rapid-Kammer. Der Hitachi-Analyser arbeitet mit der Methode der Bromcresolgrün-Komplexbildung. Aus der Literatur geht hervor, dass mit dieser Methode zuverlässige und genaue Ergebnisse zu erzielen sind (Slater et al., 1975; Gustafsson et al., 1976). Dahingegen ist die Ungenauigkeit der elektrophoretischen Bestimmung bekannt (Sauer u. Hirschberger, 1992), ebenso wie die Ursachen dafür. Zum einen ist dafür die Beschaffenheit der Celluloseacetatfolie verantwortlich, die nur über eine geringe Anzahl von freien Hydroxylgruppen verfügt und ein großes Hohlraumvolumen (80 %) besitzt. Dadurch wird den Proteinen praktisch keine räumliche Behinderung entgegengesetzt, und sie werden kaum von der Trägerfolie adsorbiert (Schütz, 1971; Blauärmel, 1978). Die Proteine anderer Fraktionen wandern deshalb teilweise bis in den Bereich der Albuminfraktion, der sie bei der Auswertung dann zugerechnet werden (Schütz, 1971; Slater et al., 1975; Blauärmel, 1978). Nach Slater et al. (1975) ist die unterschiedliche Affinität der einzelnen Proteinfractionen für den Farbstoff ein weiterer Grund. Albumin zeigt eine stärkere Affinität als die anderen Fraktionen. Dadurch wird der prozentuale Anteil des Albumins am Gesamtprotein größer.

Die Beschaffenheit der Celluloseacetatfolie bedingt wohl grundsätzlich die Unterschiede zwischen den Methoden. Ob die Farbstoffaffinität zusätzlich die Albuminbestimmung beeinflusst, ist fraglich, da die Studie von Slater et al. (1975) auf Untersuchungen mit Amidoschwarz und nicht mit Ponceau S, dem in dieser Studie verwendeten Farbstoff, beruhen.

Die elektrophoretischen Methoden sind zwar signifikant für alle Parameter miteinander korreliert, können aber keine genaue Übereinstimmung erzielen. Das

Gerät Elphoscan Mini arbeitet im Gegensatz zur Elpho-Mikro-Rapid-Kammer vollautomatisch. Besonders beim Auftragen der Seren mit dem Stempel auf die Folie kann hierdurch eine wesentlich höhere Präzision erreicht werden. Bei der Elpho-Mikro-Rapid-Kammer erfolgt dieser Schritt durch Handarbeit des Laboranten. Weitere Fehlerquellen der halbautomatisch arbeitenden Elpho-Mikro-Rapid-Kammer sind die genaue Abmessung von Flüssigkeiten wie Pufferlösung und Färbelösung und das genaue Einhalten von Zeitvorgaben. Gerade die Menge der Pufferlösung kann nach Kohn (1957) die Breite der Banden beeinflussen. Auch die Auswertungsgeräte wirken sich auf die Ergebnisse aus (Slater et al., 1975). Die densitometrische Messung erfolgt bei Elphoscan Mini vollautomatisch, und der Scanner ist mit in die Apparatur integriert. Die Probe wird vom Auftragen bis zum Scannen in einem Arbeitsdurchgang bearbeitet. Bei Elskript 1, das zur Auswertung der bearbeiteten Folien der Elpho-Mikro-Rapid-Kammer dient, handelt es sich wiederum um ein nur halbautomatisches Gerät. Selbst bei sehr sorgfältigem Vorgehen des Laboranten sind kleine Ungenauigkeiten unvermeidbar. Beispielsweise müssen die Grenzen der Messstrecke manuell eingestellt werden. Wird der Anfang zu nahe bei der Albuminbande gewählt, kommt es zu fehlerhaften Messungen.

Das Erreichen einer höheren Präzision mit der vollautomatischen Methode steht in Einklang mit den Untersuchungen von Bossuyt et al. (1998). Die Verschiebung zu Gunsten des Albumins ist beim Gerät Elphoscan nicht so ausgeprägt; dadurch verteilen sich die „gewonnenen“ Proteinmoleküle auf die Globulinfraktionen und ergeben in diesen Fraktionen höhere Ergebnisse (vgl. Tab. 24).

Obwohl die Werte der beiden Geräte teilweise differieren, stimmen die erhaltenen Elektrophoresemuster überein (vgl. Abb. 17 bis 22). Beim Gerät Elphoscan Mini sind teilweise im Bereich der α_2 - und β -Globuline mehr Unterfraktionen zu erkennen. Außerdem ist im Elektropherogramm des sechs Wochen alten Hundes zusätzlich eine α_0 -Fraktion zu erkennen, die mit dem Albumin verfließt. Diese Fraktion bildet sich weder im Elektropherogramm dieses Tieres der Elpho-Mikro-Rapid-Kammer noch bei einem der älteren Tiere, unabhängig von der verwendeten Methode, ab. Die Albuminfraktion kann daher bei Jungtieren auch dadurch fälschlich erhöht werden - zumindest die mit dem Gerät Elphoscan Mini ermittelten Werte. Es scheint sich aber um eine unwesentliche Erhöhung zu handeln, da für diesen Parameter ein signifikanter Anstieg bis zum

Erwachsenenalter nachweisbar ist und die Werte dieser Altersgruppe gut mit den Ergebnissen von anderen Autoren (Kuhl et al., 2000) und dem Hitachi-Analyser übereinstimmen.

Abschließend sei darauf hingewiesen, dass die Auswertung von Elektropherogrammen immer von der Subjektivität der auswertenden Person beeinflusst wird, da diese die Fraktionsgrenzen setzt, und dann erst aus den dadurch gebildeten Flächen die prozentualen und absoluten Werte errechnet werden können. In dieser Studie konnte der erhaltene Kurvenzug eines Gerätes mit dem des anderen verglichen und auf Übereinstimmung überprüft werden. Waren die Fraktionsgrenzen in manchen Fällen unklar, konnte der Kurvenzug des einen Gerätes als Entscheidungshilfe für den des anderen Gerätes dienen. Dadurch wird der subjektive Einfluss auf die Ergebnisse gemindert. Die Subjektivität der Auswertung ist ein weiterer Grund, weshalb bei der Interpretation von elektrophoretischen Ergebnissen das Elektropherogramm betrachtet werden sollte.

Trotz der diskutierten Unterschiede zwischen den Messgeräten stimmen die Ergebnisse bezüglich der Altersabhängigkeit der Parameter, ihrem Kurvenverlauf und die Analysen der Gewichtsklassen bei allen drei verwendeten Geräten weitgehend überein.

6 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde die Altersabhängigkeit der Parameter Gesamtprotein, Albumin, α_1 -Globuline, α_2 -Globuline, β -Globuline, γ -Globuline und des Albumin-Globulin-Quotienten beim Hund untersucht. Hierfür wurden 406 Blutproben gewonnen, die von gesunden Hunden stammten. Das Alter, der in die Untersuchungen einbezogenen Hunde, lag zwischen sechs Wochen und 16 Jahren. Die Hunde wurden in neun Altersgruppen eingeteilt. Die Proteinfractionen wurden mit zwei Celluloseacetatfolien-Elektrophoresegeräten bestimmt. Ein vollautomatisches und ein halbautomatisches Analysengerät kamen hierbei zum Einsatz. Die quantitative Bestimmung des Albumins erfolgte zusätzlich mit der Bromcresolgrünmethode. Bezüglich der Altersabhängigkeit der untersuchten Parameter stimmen die Ergebnisse der verwendeten Messgeräte weitgehend überein. Die aus der Literatur bekannte Ungenauigkeit der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese bei der quantitativen Proteinbestimmung zeigte sich aber auch bei diesen Untersuchungen, wobei das vollautomatische Gerät die genaueren Ergebnisse lieferte.

Für jeden der oben genannten Parameter konnte eine signifikante Altersabhängigkeit nachgewiesen werden. Das Gesamtprotein stieg lebenslang, kontinuierlich und signifikant an. Der Mittelwert erhöhte sich entsprechend von $45,5 \pm 1,55$ g/l (0 bis 6 Wochen alte Tiere) auf $66,1 \pm 4,40$ g/l (>10 Jahre alte Tiere). Die mit der Bromcresolgrünmethode bestimmten absoluten Albuminwerte nahmen bis zum Alter von ein bis zwei Jahren statistisch nachweisbar zu (Mittelwerte: $30,0 \pm 1,81$ g/l (0 bis 6 Wochen alte Tiere), $36,8 \pm 3,15$ g/l (>1 bis 2 Jahre alte Tiere)). Danach wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt. Die mit dem vollautomatischen Elektrophoresegerät bestimmten relativen Albuminwerte sanken lebenslang signifikant ab. Der Mittelwert verringerte sich von $67,2 \pm 2,67$ % auf $56,2 \pm 3,20$ %.

Im Folgenden werden für die Globulinfractionen die Ergebnisse und die Mittelwerte des vollautomatischen Geräts aufgeführt:

Die absoluten Werte der α_1 -Globulinfraction nahmen vom Welpenalter (0 bis 6 Wochen alte Tiere: $4,1 \pm 0,37$ g/l) bis zum vollendeten ersten Lebensjahr (>6 bis 12 Monate alte Tiere: $3,4 \pm 0,65$ g/l) statistisch nachweisbar ab. Die relativen

Werte dieser Fraktion zeigten dieses Verhalten vom Welpenalter ($8,9 \pm 0,57 \%$) bis zur Gruppe der ein- bis zweijährigen Tiere ($5,1 \pm 1,11 \%$).

Die absoluten α_2 -Globulinwerte stiegen von der jüngsten Gruppe (0 bis 6 Wochen alte Tiere: $2,8 \pm 0,39 \text{ g/l}$) bis zur Gruppe der ein- bis zweijährigen Tiere ($4,9 \pm 1,44 \text{ g/l}$) und von der Gruppe der fünf- bis achtjährigen Tiere ($4,9 \pm 1,34 \text{ g/l}$) bis zur ältesten Gruppe (>10 Jahre alte Tiere: $5,7 \pm 1,18 \text{ g/l}$) signifikant an. Zwischen dem zweiten und achten Lebensjahr veränderten sich die Werte nicht signifikant. Die relativen α_2 -Globulinwerte nahmen zwischen der jüngsten ($6,2 \pm 0,82 \%$) und der ältesten Gruppe ($8,6 \pm 1,61 \%$) signifikant zu.

Für die β -Globulinfraktion wurde eine lebenslange, signifikante Zunahme der absoluten (von $6,3 \pm 0,99 \text{ g/l}$ auf $13,5 \pm 1,61 \text{ g/l}$) und relativen Werte (von $13,8 \pm 1,99 \%$ auf $20,3 \pm 2,06 \%$) gefunden. Allerdings war im Alter von vier Monaten bis zu einem Jahr keine statistisch relevante Veränderung zu verzeichnen.

Die relativen und absoluten γ -Globulinwerte stiegen signifikant vom Welpenalter ($1,8 \pm 0,27 \text{ g/l}$, $3,9 \pm 0,64 \%$) bis zur Gruppe der ein bis zwei Jahre alten Tiere ($6,2 \pm 1,51 \text{ g/l}$, $9,8 \pm 2,05 \%$) an.

Der Albumin-Globulin-Quotient zeigte eine lebenslange, signifikante Abnahme, mit der Einschränkung, dass zwischen dem sechsten Lebensmonat und dem fünften Lebensjahr keine statistisch relevanten Veränderungen nachgewiesen wurden. Der Mittelwert sank von $2,1 \pm 0,27$ (0 bis 6 Wochen alte Tiere) auf $1,3 \pm 0,18$ (>10 Jahre alte Tiere) ab.

Inwieweit die unterschiedliche Wachstumsdauer, der unterschiedliche Alterungsprozess und die differierende Lebenserwartung von kleinen, mittelgroßen, großen Rassen und Riesenrassen den Verlauf der untersuchten Parameter beeinflussen, wurde durch den Vergleich von Gewichtsgruppen innerhalb verschiedener Altersgruppen untersucht. Es stellte sich aber heraus, dass die Einteilung der Hunde nach dem Gewicht dieses Problem nicht aussagekräftig analysieren kann.

7 Summary

Determination of serum albumin and serum globulins in dependency of age in dogs

The age dependency of the parameters total protein, albumin, α_1 -globulins, α_2 -globulins, β -globulins, γ -globulins and the albumin-globulin-ratio in dogs was examined in this study. Therefore 406 blood samples from clinically healthy dogs were taken. The dogs ranged in age from six weeks to 16 years and were distributed in nine groups of age. The protein fractions were determined by two cellulose acetate electrophoresis gadgets. Therefore an automatic and a semiautomatic gadget were used. Additionally, the bromcresol green method was used for the quantitative determination of albumin. Regarding the age dependency of the examined parameters the results of the used gadgets correspond to each other. The problem of imprecision of cellulose acetate electrophoresis which is described in literature was also noticed in this study; the results of the automatic gadget were more exact.

For each of the abovesly mentioned parameters a significant age dependency could be proofed. Total protein increased continuously and significantly during the whole life. The mean value increased correspondingly from 45.5 ± 1.55 g/l (0 up to 6 weeks old animals) up to 66.1 ± 4.40 g/l (more than 10 years old animals). The values of albumin determined by the bromcresol green method increased statistically demonstrable until the age of one to two years (mean values: 30.0 ± 1.81 g/l (0 up to 6 weeks old animals), 36.8 ± 3.15 g/l (more than 1 and up to 2 years old animals)). Afterwards no significant changes could be seen. Concerning the values of relative albumin, a lifelong, significant decrease resulted from measuring with the automatic electrophoresis gadget; the mean value decreased from 67.2 ± 2.67 % to 56.2 ± 3.20 %.

By the following, the results and the mean values of the globulin fractions, determined by the automatic gadget, are listed:

The absolute values of the α_1 - globulin fraction decreased statistically provable from puppy age (0 up to 6 weeks old animals: 4.1 ± 0.37 g/l) to the end of the first year of life (more than 6 and up to 12 months old animals: 3.4 ± 0.65 g/l). The

relative values of this fraction showed the same attitude from puppy age ($8.9 \pm 0.57 \%$) up to the group of the one to two years old animals ($5.1 \pm 1.11 \%$).

The absolute values of α_2 -globulins increased significantly from the youngest group (0 up to 6 weeks old animals: $2.8 \pm 0.39 \text{ g/l}$) up to the group of the one to two years old animals ($4.9 \pm 1.34 \text{ g/l}$) and from the group of the five to eight years old animals ($4.9 \pm 1.34 \text{ g/l}$) up to the oldest group (more than 10 years old animals: $5.7 \pm 1.18 \text{ g/l}$). Between the 2nd and the 8th year of life no significant differences could be found. The relative values of α_2 -globulins increased significantly between the youngest ($6.2 \pm 0.82 \%$) and the oldest group ($8.6 \pm 1.61 \%$).

For the β - globulin fraction a lifelong significant increase of the absolute (from $6.3 \pm 0.99 \text{ g/l}$ to $13.5 \pm 1.61 \text{ g/l}$) and relative values (from $13.8 \pm 1.99 \%$ to $20.3 \pm 2.06 \%$) were found. However, for the age from four months up to one year of life no statistically relevant increase could be seen.

The relative and the absolute values of γ -globulins increased significantly from puppy age ($1.8 \pm 0.27 \text{ g/l}$, $3.9 \pm 0.64 \%$) to the group of one to two years old animals (6.2 ± 1.51 , $9.8 \pm 2.05 \%$).

The albumin- globulin- ratio showed a lifelong significant decrease qualifying that between the 6th month and the 5th year of life no statistically relevant changes were provable. The mean value decreased from 2.1 ± 0.27 (0 up to 6 weeks old animals) to 1.3 ± 0.18 (more than 10 years old animals).

To investigate the influence of the different growth and ageing process and the different life expectancy of small, medium, large and giant breeds on the course of the examined parameters, groups of weight were compared in different groups of age. But distributing the dogs to groups of weight could not analyze this problem expressively.

8 Literaturverzeichnis

Abe F, Yano M, Minami Y, Ueda T, Chikakiyo H, Miyamoto N, Shirakawa N, Shima K. Alterations in fructosamine and glycated albumin levels during childhood. *Ann Clin Biochem* 1989; 26: 328-331

Allard RL, Douglass GM, Kerr WW. The Effects of Breed and Sex on Dog Growth. *Comp Anim Prac* 1988; 2:15-19

Alper CA. Plasma Protein Measurement as a Diagnostic Aid. *New Eng J Med* 1974; 287-290

Barsanti JA, Kristensen F, Drumheller FB. Analysis of Serum Proteins ,Using Agarose Electrophoresis in Normal Dogs and in Dogs Naturally Infected with *Dirofilaria immitis*. *Am J Vet Res* 1977; 38: 1055-1058

Batamuzi EK, Kristensen F, Jensen AL. Serum Protein Electrophoresis: Potential Test for Use in Geriatric Companion Animal Health Programmes. *J Vet Med A* 1996; 43: 501-508

Behr W, Shlimok G, Firchau V, Paul HA. Determination of Reference Intervals for 10 Serum Proteins Measured by Rate Nephelometry, Taking into Consideration Different Sample Groups and Different Distribution Functions. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985; 23: 157-166

Blauärmel H. Gegenüberstellung quantitativer Bestimmungen der Eiweißfraktionen des Blutplasmas klinisch gesunder Rinder mit der Zelluloseazetatfolien- und der Mikro-Agargel-Elektrophorese. *Arch Exper Vet Med* 1978; 32: 525-530

Boguth W. Papierelektrophoretische Serumuntersuchungen bei Haussäugetieren. *Zbl Vet Med* 1954; 1: 168-185

Bossuyt X, Bogaerts A, Schiettekatte G, Blanckaert N. Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system. Clin Chem 1998; 44: 944-949

Brackenridge CJ. Optimal Fractionation Conditions for the Quantitative Analysis of Human Serum Protein Fractions by Cellulose Acetate Electrophoresis. Analyt Chem 1960; 32: 1357-1359

Bronson RT. Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. Am J Vet Res 1982; 43: 2057-2059

Bulgin MS, Shifrine M, Galligan SJ. Electrophoretic Analyses of Normal Beagle Serum Proteins. Lab Anim Sci 1971; 21: 275-279

Bush B. Examination of geriatric small animals. In Practice 1993; 15: 139-145

Center SA, Hornbuckle WE. Normal Values for Serum Indicators of Hepatobiliary Disorders in Young Dogs and Cats. In: Veterinary Pediatrics Dogs and Cats from Birth to Six Months. Hoskins JD. Hrsg. 3. Aufl. Philadelphia: W.B. Saunders Comp. 2001; 201

Conner JG, Eckersall PD, Douglas TA. Inhibition of elastase by canine serum: demonstration of an acute phase response. Res Vet Sci 1988; 44: 391-393

Conner JG, Eckersall PD, Ferguson J, Douglas TA. Acute phase response in the dog following surgical trauma. Res Vet Sci 1988; 45: 107-110

Day MJ, Penhale WJ. Serum immunoglobulin A concentrations in normal and diseased dogs. Res Vet Sci 1988; 45: 360-363

Dillman RC, Coles EH. A Canine Serum Fraction Analogous to Human C-Reactive Protein. Am J Vet Res 1966; 27: 1769-1775

Eckersall PD, Conner JG. Bovine And Canine Acute Phase Proteins. Vet Res Comm 1988; 12: 169-178

Eder H. Blut und Lymphe. In: Lehrbuch der Veterinärphysiologie. Scheunert A, Trautmann A, Hrsg. 7. Aufl. Berlin; Hamburg: Paul Parey Verlag 1987; 160-207

Fukuda S, Kawashima N, Iida H, Aoki J, Tokita K. Age Dependency of Hematological Values and Concentrations of Serum Biochemical Constituents in Normal Beagles from 1 to 14 Years of Age. Jpn J Vet Sci 1989; 51: 636-641

Ganrot PO. Variation of the α_2 -Macroglobulin Homologue with Age in some Mammals. Scand J clin Lab Invest 1968; 21: 177-181

Ganrot K. Plasma Protein Response in Experimental Inflammation in the Dog. Res Exp Med 1973; 161: 251-261

Glickman LT, Shofer FS, Payton AJ, Laster HL, Felsburg PJ. Survey of serum IgA, IgG, and IgM concentrations in a large Beagle population in which IgA deficiency had been identified. Am J Vet Res 1988; 49: 1240-1245

Goldston RT. Preface. Geriatrics and Gerontology, Vet Clin North Am 1989; IX-X

Goldston RT. Introduction and Overview of Geriatrics. In: Geriatrics & Gerontology of the Dog and Cat. Goldston RT, Hoskins JD. Hrsg. 1. Aufl. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1995; 1-9

Green SA, Jenkins SJ, Clark PA. A comparison of chemical and electrophoretic methods of serum protein determinations in clinically normal domestic animals of various ages. Cornell Vet 1982; 72: 416-426

Gressner AM. Veränderungen der Proteinfractionen im Plasma (Dysproteinämien). In: Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. Greiling H, Gressner AM. Hrsg. 3. Aufl. Stuttgart: Schattauer Verlag 1994; 209-215

Griot-Wenk ME, Busato A, Welle M, Racine BP, Weilenmann R, Tschudi P, Tipold A. Total serum IgE and IgA antibody levels in healthy dogs of different breeds and exposed to different environments. Res in Vet Sci 1999; 67: 239-243

Groulade P, Groulade J, Ollivier C. Serum Protein Electrophoresis in Canine Practice. J Small Anim Pract 1970; 10: 705-724

Groulade P, Groulade J, Gros Lambert P. Protéines sériques du chat normal selon l'âge. Electrophorèse sur acétate de cellulose. Bull Acad Vét de France 1978; 51: 201-210

Gustafsson JEC. Improved Specificity of Serum Albumin Determination and Estimation of „Acute Phase Reactants“ by Use of the Bromgresol Green Reaction. Clin Chem 1976; 22: 616-622

Hayashi S, Jinbo T, Iguchi K, Shimizu M, Shimada T, Nomura M, Ishida Y, Yamamoto S. A Comparison of the Concentrations of C-reactive Protein and α_1 -Acid Glycoprotein in the Serum of Young and Adult Dogs with Acute Inflammation. Vet Res Commun 2001; 25: 117-126.

Hughes D, Elliott DA, Washabau RJ, Kueppers F. Effects of age, sex, reproductive status, and hospitalization on serum α_1 -antitrypsin concentration in dogs. Am J Vet Res 1995; 56:568-572

Ikeuchi J, Yoshizaki T, Hirata M. Plasma biochemistry values of young Beagle dogs. J Tox Sci 1991; 16: 49-59

Kaspar LV, Norris WP. Serum chemistry values of normal dogs (Beagles): associations with age, sex, and family line. *Lab Ani Sci* 1977; 27: 980-985

Kent J. Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis. *Br Vet J* 1992; 148: 279-282

Kohn J. A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis. *Clin Chim Acta* 1957; 2: 297-303

Korotzer JL, Bergquist LM, Searcy RL. Use of cellulose acetate and Ponceau S for electrophoretic serum protein analysis. *Am J of Med Tech* 1961; 27 197-203

Kozma CK, Pelas A, Salvador RA. Electrophoretic Determination of Serum Proteins of Laboratory Animals. *J A V M A* 1967; 151: 865-869

Kraft W, Hartmann K, Dereser R. Altersabhängigkeit von Laborwerten bei Hund und Katze. *Tierärztl Prax* 1996; 24: 610-615

Kraft W. Geriatrie bei Hund und Katze. Hrsg. 1. Aufl., Berlin Parey Buchverlag 1998; 4

Kraft W, Dürr UM. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Hrsg. 5. Aufl. Stuttgart: Schattauer Verlag 1999; 148-155

Kristensen F, Barsanti JA. Analysis of Serum Proteins in Clinically Normal Pet and Colony Cats, Using Agarose Electrophoresis. *Am J Vet Res* 1977; 38: 399-402

Kuhl S, Mischke R, Lund C, Günzel-Apel AR. Referenzwerte klinisch-chemischer Blutparameter bei Hundewelpen in den ersten acht Lebenswochen. *Dtsch tierärztl Wschr* 2000; 107: 438-443

Lösch U, Cihak J, Erhard MH, Kaspars B. Blut und Abwehr. In: Physiologie der Haustiere. Engelhardt W, Breves G. Hrsg. 1. Aufl. Stuttgart: Enke im Hippokrates Verlag GmbH 2000: 190-216

Lowseth LA, Gillet NA, Gerlach RF, Muggenburg BA . The Effects of Aging on Haematology and Serum Chemistry Values in the Beagle Dog. Vet Clin Pathol 1990; 19: 13-19

Mbassa GK, Poulsen JSD. Profiles of Some Clinical Chemical Parameters in Growing Dwarf and Landrace Kids. J Vet Med 1991; A 38: 676-690

McKelvie DH, Powers S, McKim F. Microanalytical Procedures for Blood Chemistry Long-Term Study on Beagles. Am J Vet Res 1966; 27: 1405-1411

Meier H, Garlt C, Krüger I. Quantitative Bestimmungen der Eiweißfraktionen des Blutserums klinisch gesunder Hunde mit der Mikro-Agargel-Elektrophorese. Arch Exper Vet Med 1984; 38: 211-218

Messow C, Hermanns W. Entzündung. In: Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie. Kitt T, Schulz LC. Hrsg. 10. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag 1990; 275-311

Michaelson M, Scheer K, Gilt S. The Blood of the Normal Beagle. J A V M A 1966; 148: 532-534

Mosier JE. Effects of Aging on Body Systems of the Dog. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 1989; 19: 1-12

Modiano JF. Immunoglobulins. In: Schalm's Veterinary Hematology. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. Hrsg. 5. Aufl. Lippincott Williams & Wilkins 2000; 904-909

Nelson RW, Couto CG. Small Animal Internal Medicine. Hrsg. 2. Aufl. St. Louis: Mosby Inc. 1998; 1218-1220

Osbaldiston GW. Serum protein fractions in domestic animals. Br Vet J 1972; 128: 386-392

Phillips KR, Dewhirst MW, Gillette EL, Clow DJ. Electrophoretic evaluation of sera from dogs with cancer. Am J Vet Res 1978; 39: 1482-1486

Pickrell JA, Schluter SJ, Belasich JJ, Stewart EV, Meyer J, Hobbs CH, Jones RK. Relationship of Age of Normal Dogs to Blood Serum Constituents and Reliability of Measured Single Values. Am J Vet Res 1974; 35: 897-903

Racine BP, Marti E, Busato A, Weilenmann R, Lazary S, Griot-Wenk ME. Influence of sex and age on serum total immunoglobulin E concentration in Beagles. Am J Vet Res 1999; 60: 93-97

Reed AH, Cannon DC, Winkelman JW, Bhasin YP, Henry RJ, Pileggi VJ. Estimation of Normal Ranges from a Controlled Sample Survey. I. Sex-and Age-Related Influence on the SMA 12/60 Screening Group of Tests. Clin Chem 1972; 18: 57-66

Riley RF, Zontine W. Further observations on the properties of dog C-reactive protein and the C-reactive protein response in the dog. J Lab Clin Med 1972; 80: 698-703

Rink L, Seyfarth M. Besonderheiten immunologischer Untersuchungsergebnisse im Alter. Z Gerontol Geriat 1997; 30: 220-225

Rüsse I. Veränderungen der Blutzusammensetzung bei neugeborenen Hundewelpen. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 1971; 13: 249-252

Salatka K, Kresge D, Harris L, Edelstein D, Ove P. Rat serum protein changes with age. Exp Geront 1971; 6: 25-36

Salomon FV, Schulze A, Böhme U, Arnold U, Gericke A, Gille U. Das postnatale Wachstum des Skeletts und der Körpermasse beim Beagle. Anat Histl Embryol 1999; 28: 221-228

Sauer UG, Hirschberger J. Cellulose-Acetatfolien-Elektrophorese, radiale Immunodiffusion und Nephelometrie – Methodenvergleich im Rahmen der Albuminbestimmung. Tierärztl Prax 1992; 20: 110-113

Schalm OW. Clinical Significance of Plasma Protein Concentration. J A V M A 1970; 157: 1672-1675

Schreiber M, Kantimm D, Kirchhoff D, Heimann G, Bhargava AS. Concentrations in Serum of IgG, IgM and IgA and Their Age-Dependence in Beagle Dogs as Determined by a Newly Developed Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA). Eur J Clin Chem Clin Biochem 1992; 30: 775-778

Schütz E. Die Celluloseacetatfolien-Elektrophorese Kurzzeit-und Mikromethode. Normalwerte beim Hund. Kleint-Prax 1971;16:1-3

Schultz RD. The Effects of Aging on the Immune System. Compend Cont Educ 1984; 6: 1096-1105

Schulze A, Ritscher D, Salomon FV. Das Körpermassewachstum der Deutschen Dogge. Kleint-Prax 1997; 42: 967-972

Sellar GC, DeBeer MC, Lelias JM, Snyder PW, Glickman LT, Felsburg PJ, Whitehead AS. Dog Serum Amyloid A Protein. Identification of isoforms defined by cDNA and protein analyses. J Biol Chem 1991; 266: 3505-3510

Sevelius E, Andersson M. Serum protein electrophoresis as a prognostic marker of chronic liver disease in dogs. Vet Rec 1995; 137: 663-667

Slater L, Carter PM, Hobbs JR. Measurement of Albumin in the Sera of Patients. Ann Clin Biochem 1975; 12: 33-40

Strasser A, Niedermüller H, Hofecker G, Laber G. The Effect of Aging on Laboratory Values in Dogs. J Vet Med 1993; A 40: 720-730

Strasser A, Teltscher A, May B, Sanders C, Niedermüller H. Age-associated Changes in the Immune System of German Shepherd Dogs. J Vet Med A 2000; 47: 181-192

Tasker JB. Reference values for clinical chemistry using the coulter chemistry system. Cornell Vet 1978; 68: 460-479

Thomas JS. Overview of Plasma Proteins. In: Schalm's Veterinary Hematology. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. Hrsg. 5. Aufl. Lippincott Williams & Wilkins 2000; 891-898

Thomas JS. Protein Electrophoresis. In: Schalm's Veterinary Hematology. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. Hrsg. 5. Aufl. Lippincott Williams & Wilkins 2000; 899-903

Thompson D, Milford-Ward A, Whicher J T. The value of acute phase protein measurements in clinical practice. Ann Clin Biochem 1992; 29: 123-131

Tizard IR. Veterinary Immunology. An Introduction. Hrsg. 6. Aufl. Philadelphia: W. B. Saunders Company 2000; 44

Tomoda I. Paper electrophoretic studies on serum proteins in domestic animals. I. Serum proteins in healthy animals. Jpn J Vet Sci 1962; 24: 337-348

Tomoda I. Paper electrophoretic studies on serum proteins in domestic animals. II. Normal values and physiological variations of serum proteins in dogs. Jpn J Vet Sci 1963; 25 (1): 5-19

Tumbleson ME, Burks MF, Wingfield WE. Serum protein concentrations as a function of age, in female dairy cattle. Cornell Vet 1973; 63: 65-71

Vesselinovitch SD. The analysis of serum proteins of domestic animals by filter-paper electrophoresis. A review. Cornell Vet 1959; 49: 82-96

Webster D. A study of interaction of bromocresol green with isolated serum globulin fractions. Clin Chim Acta 1974; 53: 109-115

Whicher JT, Spence CE. Serum protein zone electrophoresis - an outmoded test? Ann Clin Biochem 1987; 24: 133-139

Witt I, Trendelenburg C. Gemeinsame Studie zur Erstellung von Richtwerten für klinisch-chemische Kenngrößen im Kindesalter. J Clin Chem Clin Biochem 1982; 20: 253-242

Wolford ST, Schroer RA, Gohs FX, Gallo PP, Falk HB, Dente AR. Effect of Age on Serum Chemistry Profile, Electrophoresis and Thyroid Hormones in Beagle Dogs Two Weeks to One Year of Age. Vet Clin Path 1988; 17: 35-42

Yamada T, Kakinoki M, Totsuka K, Ashida Y, Nishizono K, Tsuch Kobayashi K. Purification of canine alpha-fetoprotein and alpha-fetoprotein values in dogs. Vet Immunol Immunopathol 1995; 47: 25-33

Yamashita K, Fujinaga T, Hagio M, Miyamoto T, Izumisawa Y, Kotani T. Bioassay for Interleukin-1, Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor-Like Activities in Canine Sera. J Vet Med Sci 1994; 56: 103-107

Yamashita K, Fujinaga T, Miyamoto T, Hagio M, Izumisawa Y, Kotani T. Canine Acute Phase Response: Relationship between Serum Cytokine Activity and Acute Phase Protein in Dogs. J Vet Med Sci 1994; 56: 487-492

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wilfried Kraft für die Überlassung des Themas, für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit, für seine Anregungen und seine Unterstützung.

Frau Margit Kolross und ihren Mitarbeiterinnen danke ich herzlich für die engagierte Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der I. Medizinischen Tierklinik und der Chirurgischen Tierklinik München sowie bei der Kleintierklinik in Bremen bedanke ich mich für die unermüdliche Bereitschaft mir bei der Gewinnung der Blutproben behilflich zu sein.

Schließlich sei allen, die mir Kontakte zu Hundebesitzern hergestellt haben, mein herzlicher Dank ausgesprochen.

Bei meiner Schwester Vera bedanke ich mich für die Hilfe bei der Übersetzung ins Englische.

Meinem Mann danke ich für seine Unterstützung während meiner Doktorandenzeit.

Lebenslauf

Name:	Ruth Dusch, geb. Knorr
Geburtsdatum:	23. August 1971
Geburtsort:	Stuttgart
Eltern:	Dr. Dipl.-Ing. Eckhard Knorr und Elsbeth Knorr, geb. Schneider
1977-1981	Besuch der Grundschule in Donzdorf
1981-1990	Besuch des Rechberg Gymnasiums in Donzdorf
1990-1996	Studium der Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München
24. 9. 1996	Approbation
Oktober 1996	Beginn der Tätigkeit als angestellte Tierärztin in der Praxis Dr. med. vet. R. Barth, Donzdorf
23. 5. 1997	Eheschließung mit Sebastian Dusch
15. 7. 1997	Beendigung des Arbeitsverhältnis in Donzdorf und Wechsel in die Gemeinschaftspraxis Dr. med. vet. H. Görblich und Dr. med. vet. J. Hopf, Wartenberg
ab Dezember 1997 bis Mai 2000	angestellte Tierärztin in der Kleintierpraxis Dr. med. vet. A. Junk, Germering
ab März 2000	Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit in der I. Medizinischen Tierklinik der Ludwig- Maximilians-Universität in München